



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE
DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE**

**EFEITO AGUDO DA ASSOCIAÇÃO DO EXERCÍCIO COM CHOQUE TÉRMICO SOBRE
A RESPOSTA AO ESTRESSE E PERFIL LIPÍDICO EM ANIMAIS OBESOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANALÚ BENDER DOS SANTOS

Ijuí-RS, 2017

**EFEITO AGUDO DA ASSOCIAÇÃO DO EXERCÍCIO COM CHOQUE TÉRMICO SOBRE
A RESPOSTA AO ESTRESSE E PERFIL LIPÍDICO EM ANIMAIS OBESOS**

Por
ANALU BENDER DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde. Programa em rede entre a Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), e a Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Atenção Integral à Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Stela Ludwig
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Gomes Heck

Ijuí-RS, Brasil 2017

Catálogo na Publicação

S237v Santos, Analú Bender dos.
Efeito agudo da associação do exercício com choque térmico sobre a resposta ao estresse e perfil lipídico em animais obesos / Analú Bender dos Santos. – Ijuí, 2017.
57 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Campus Ijuí). Atenção Integral à Saúde.

“Orientadora: Mirna Stela Ludwig.”
“Coorientador: Thiago Gomes Heck.”

1.HSP70. 2.Obesidade. 3.Índice H. 4.Exercício. 5.Choque Térmico. I. Ludwig, Mirna Stela. II. Heck, Thiago Gomes. III. Título.

CDU: 616.34

Jusélia Paula da Silva
CRB10/2341

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE
DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

EFEITO AGUDO DA ASSOCIAÇÃO DO EXERCÍCIO COM CHOQUE
TÉRMICO SOBRE A RESPOSTA AO ESTRESSE E
PERFIL LÍDICO EM ANIMAIS OBESOS

elaborada por:

Analú Bender dos Santos

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Atenção Integral à Saúde



Prof^a. Dr^a. Mirna Stela Ludwig
(Orientadora)



Prof. Dr. Thiago Gomes Heck
(Co-orientador)

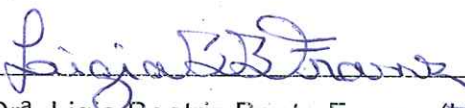
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Antônio Azambuja Miragem – (IF Farroupilha – Santa Rosa)



Prof. Dr. Matias Nunes Frizzo - (UNIJUÍ)



Prof^a. Dr^a. Ligia Beatriz Bento Franz - (UNIJUÍ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, e, principalmente ao meu marido Elias Ricardo Borré da Silva, pelo constante apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos cruciais vividos nestes quase três anos de mestrado. E a nossa filha Yolanda que está a caminho, abençoando ainda mais essa jornada.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Prof. Dra. Mirna Stela Ludwig por acreditar no meu potencial desde a iniciação científica até o mestrado. Por estar sempre disponível para me ouvir e me aconselhar na vida pessoal e científica, sempre me incentivando a ir além dos meus limites. Por todas as vezes que virou pra mim e me perguntou “Analú! O que está fazendo?”.

Ao meu coorientador e amigo Prof. Dr. Thiago Gomes Heck por ter me apresentado ao grupo de pesquisa em fisiologia (GPeF) que tornou-se minha segunda família, na qual meu curso de educação física fez ainda mais sentido. Por proporcionar a todos nós a oportunidade de ver a ciência como algo possível e ao nosso alcance. Por todas as vezes que entrou no laboratório e me chamou do seu jeito único “Analúúúúúú”.

A estes dois grandes professores, Mirna e Thiago, pelas cobranças e elogios que tanto nos engrandecem e nos fortalecem como indivíduo e como grupo. Pela incansável força de vontade de elevar cada aluno ao seu ponto mais alto de desenvolvimento. Por nos proporcionar tantas festas/confraternizações com madrugadas a fora, sempre repletas de muita música e alegria. Por sempre nos lembrarem das razões que temos para continuar e não nos deixar perecer.

Aos meus colegas de mestrado e amigos Jéssyca Bandeira Correa, Carolain Felipin Vincensi, Marcos Soares e Yana Picinin Sandri Lissarassa pelas noites e dias de laboratório e por tornar o mestrado mais leve durante nossas jornadas de bancada e de sala de aula. Um “salve, salve” para a Jéssyca que me tirou de muitos sufocos quando os cálculos da educadora física não davam muito certo, sempre me socorrendo. A Carolain que realizou parte das análises do perfil lipídico do meu mestrado, e que se dispunha a vir de Santo Ângelo para me ajudar em algumas manhãs de GTT. Ao Marcos, que sempre me auxiliou como amigo, colega e médico. A Yana que não estava na mesma turma, mas também participou da minha trajetória durante o mestrado, sempre me dando apoio e ânimo, deslocando-se de Santo Ângelo para me ajudar, e realizando também parte das análises do perfil lipídico do meu mestrado.

Aos alunos de iniciação científica, sem os quais esse trabalho teria se tornado inviável, meu muito obrigado a todos: Jaine Borges dos Santos, Lílian Corrêa Costa Beber, Maicon Machado Sulzbacher, Lucas Machado Sulzbacher, Fernanda Knopp dos Santos, Yohanna

Hannah Donato, Guilherme Wildner, João Schimidt Corso, Luana Weizenmann, Paula Taís Friske, Marlon Turcato, Denise Eliane Spengler, Renan Daniel Bueno Basso. Obrigada pelos períodos de dedicação de cada um ao meu projeto de mestrado, pela amizade, desprendimento e alegria em trabalharmos juntos. Agradeço de coração aberto a todos vocês.

As eternas colegas de laboratório Pauline Brendler Goettmes Fiorin, Bethânia Salamoni Grochanke e Fernanda Giesel Baldissera, por sempre me auxiliar em diversos momentos durante o projeto e fora dele também. Por sempre ter um ombro amigo para me ouvir e me aconselhar.

Aos demais alunos vinculados ao grupo como mestres, mestrandos, bolsistas, estagiários e voluntários que de alguma forma auxiliaram na construção deste projeto: Iberê Machado Kostrycki, Ana Lucia Belmonte Caetano, Priscila Seibert, Rafael Pereira, Bárbara Pezzini Moreira, Larissa Vilma Lohmann, Jaqueline Siede, Bruna Letícia Endl Bilibio, Larissa Katiely Bohn da Silva, Mariana Kravczuk.

Aos demais professores do grupo, que sempre participaram das discussões dos resultados desta dissertação, Matias Nunes Frizzo, Ilaine Teresinha Seibel Gehrke, Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner, Mára Lisiane Tissot Squalli Houssaini.

A parceria com o IESA através do professor Matias Nunes Frizzo e das colegas Yana e Carolain na realização das análises apresentadas nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. pela parceria com nosso grupo de pesquisa e pelo seu apoio tanto teórico quanto na realização de análises.

A UNIJUI pela infraestrutura de laboratórios.

Aos meus professores do mestrado pelos ensinamentos.

Aos meus familiares pela força, compreensão e amor dedicados a mim durante todos estes anos, sem os quais não seria fácil ter chegado até aqui. Meu muito obrigada Mãe, pai, irmã e me cunhado, meus sogros e minha cunhada.

Ao meu marido Elias Ricardo Borré da Silva por todo amor e dedicação incansáveis ao meu lado durante este período. A nossa filha Yolanda que cresceu dentro do meu ventre durante a escrita desta dissertação, e que a cada chute me lembrava do quão importante foi todo o caminho trilhado até aqui.

Meu muito obrigado a todos e todas que de alguma forma fizeram parte desta história,
da minha história.

RESUMO

As alterações globais no estilo de vida levaram a população ao aumento de adiposidade, principalmente relacionado ao acúmulo de gordura visceral e ectópica, produzindo uma epidemia de causa não infecciosa, a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2. Essas doenças são caracterizadas por distúrbios metabólicos associados à síntese de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e um quadro de resistência à ação da insulina no músculo esquelético, no fígado e tecido adiposo, resultando em disglícemia e dislipidemia. A disfunção metabólica, o estado pró-inflamatório e a resistência à insulina constituem importantes fatores de estresse celular e estão associados à diminuição da expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), proteínas com função celular *chaperona* e anti-inflamatória, portanto, de citoproteção e fundamentais na resposta celular ao estresse. A redução na concentração intracelular de HSP70 (iHSP70) predispõe os tecidos metabólicos a prejuízos e danos causados por processos oxidativos e inflamatórios, especialmente. Além disso, na obesidade, há um aumento na exportação de HSP70 para o meio extracelular (eHSP70), onde ela desempenha papel imunoregulador pró-inflamatório. O desequilíbrio na relação eHSP70/iHSP70, a favor da primeira, favorece um estado pró-inflamatório. Intervenções como o exercício aeróbio moderado e a terapia de choque térmico, isoladamente, são capazes de melhorar o quadro metabólico, oxidativo e inflamatório por meio do aumento na expressão de iHSP70. Desta forma, este estudo propõe investigar o efeito agudo do combinação de exercício aeróbio leve com choque térmico, bem como das intervenções isoladamente, sobre a expressão de iHSP70, o estado redox, sobre o *status* imunoinflamatório, por meio do índice H (razão eHSP70/iHSP70), e sobre o perfil metabólico e condições hematológicas, em modelo experimental de obesidade e resistência insulínica. Para tanto foram utilizados 50 ratos Wistar adultos, 26 submetidos à dieta hiperlipídica e 24 a dieta padrão, pelo período de 12 semanas, sendo submetidos a testes de tolerância a glicose e teste de tolerância a insulina (início e final do período de dieta) para caracterização do quadro de intolerância à glicose e resistência insulínica. Após este período os animais foram divididos em 8 grupos experimentais, distribuídos de acordo com as intervenções de exercício aeróbio leve, choque térmico e combinação de ambas intervenções. Nossos dados apontam para uma resposta citoprotetora desencadeada pelo aumento das concentrações de HSP70 em resposta ao exercício e ao choque térmico, sendo ela tecido-dependente e influenciada pela condição de obesidade. A associação do exercício com choque térmico potencializa a resposta imunoinflamatória em animais magros e favorece um melhor controle sobre o perfil lipídico, especialmente no que se refere aos triglicerídeos circulantes, em organismos em processo obesogênico.

Palavras-chave HSP70. Obesidade. Índice H. Exercício. Choque Térmico.

ACUTE EFFECT OF ASSOCIATION OF EXERCISE WITH HEAT SHOCK ON RESPONSE TO STRESS AND LIPID PROFILE IN OBESITY ANIMALS

Abstract: Global lifestyle changes led the population to increase adiposity, mainly related to the accumulation of visceral and ectopic fat, producing a non-infectious cause epidemic, obesity and type 2 diabetes mellitus. These diseases are characterized by metabolic disturbances associated with the synthesis of pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species and a resistance to insulin action in skeletal muscle, liver and adipose tissue, resulting in dysglycemia and dyslipidemia. Metabolic dysfunction, proinflammatory status, and insulin resistance constitute important cellular stress factors and are associated with decreased expression of 70 kDa heat shock proteins (HSP70), chaperone and anti-inflammatory proteins, therefore of cytoprotection and fundamental in cellular response to stress. The reduction in the intracellular concentration of HSP70 (iHSP70) predisposes the metabolic tissues to damages caused by oxidative and inflammatory processes, especially. In addition, in obesity, there is an increase in the export of HSP70 to the extracellular medium (eHSP70), where it plays a pro-inflammatory immunoregulatory role. The imbalance in the eHSP70 / iHSP70 ratio, in favor of the former, favors a pro-inflammatory state. Interventions such as moderate aerobic exercise and heat shock therapy alone are capable of improving the metabolic, oxidative and inflammatory conditions by increasing iHSP70 expression. Thus, this study proposes to investigate the acute effect of the combination of aerobic exercise with heat shock, as well as the interventions alone, on the expression of iHSP70, redox state, immunoinflammatory status, through the H index (eHSP70 / iHSP70), on the metabolic profile and hematological conditions, in an experimental model of obesity and insulin resistance. For this purpose, 50 adult Wistar rats were used, 26 were submitted to the hyperlipidic diet and 24 the standard diet, for a period of 12 weeks, being submitted to glucose tolerance test and insulin tolerance test (beginning and end of the diet period) for Characterization of the picture of glucose intolerance and insulin resistance. After this period, the animals were divided into 8 experimental groups, distributed according to the interventions of exercise, heat shock and combination of both interventions. Our data point to a cytoprotective response triggered by increased HSP70 concentrations in response to exercise and heat shock, being tissue-dependent and influenced by the obesity condition. The association of exercise with heat shock enhances the immunoinflammatory response in lean animals and allows for better control over the lipid profile, especially with regard to circulating triglycerides in organism obesogenic.

Keywords: HSP70. Obesity. H index. Exercise. Heat Shock.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Adenosina monofosfato quinase
ASC	Área sob a curva
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
DHL	Dieta hiperlipídica
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido disoxiribonucleico
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
OMS	Organização mundial da saúde
GLLUT4	Transportador de glicose do tipo 4
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSK-3 β	Glicogênio sintase kinase-3 β
GTT	Teste de tolerância à insulina
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSF-1	Fator de transcrição de choque térmico 1
HSP	Proteína de choque térmico (do inglês – <i>heat shock protein</i>)
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSP72	Proteína de choque térmico de 72 kDa
HSR	Resposta ao choque térmico
iHSP70	Proteína de choque térmico intracelular
I κ k- β	<i>IkappaB kinase</i>
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	Substrato receptor de insulina 1
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK	<i>c-jun N termina kinase</i>
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OH [·]	Hidroxila
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Ser-307	Serina-307
SOD	Superóxido dismutase
Th1	Linfócitos Th1
Th2	Linfócitos Th2
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
VO ₂ máx	Volume máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 Obesidade e Resistência Insulínica	13
1.2 Exercício Físico e Obesidade	15
1.3 Terapia Térmica e Obesidade	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 ARTIGO	20
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ITEM 1	42
ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA <i>CELL STRESS AND CHAPERONES</i>	46
ANEXO 2 – PARECER CEUA – UNIJUÍ	55

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Obesidade e Resistência Insulínica

Dados atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que o número de indivíduos obesos quase triplicou desde 1980 e que, no ano de 2014, a condição de sobrepeso atingiu 1,9 bilhão de indivíduos adultos, dentre os quais 600 milhões desenvolveram o quadro de obesidade (WHO, 2014).

Em contexto similar temos a ocorrência de outra doença metabólica, geralmente associada à obesidade, o Diabetes Mellitus (DM), que tem sido apontada como uma das maiores epidemias de causa não infecciosa no mundo. O Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa 90-95% de todos os casos de diabetes, cuja prevalência global foi estimada em 9% no ano de 2014 entre os indivíduos adultos, e a previsão é de que em 2030 o DM2 seja a 7ª principal causa de mortes no mundo (WHO, 2014).

A obesidade e o DM2 estão associados a um contexto multicausal no qual participam fatores genéticos e ambientais. O estilo de vida contemporâneo produziu importantes modificações no padrão alimentar e no nível de atividade física da maior parte da população. Com uma forte tendência ao sedentarismo e ao consumo de dietas ricas em carboidratos e gorduras, instala-se um desbalanço metabólico, responsável por gerar um saldo energético positivo, com armazenamento do excedente energético em células adiposas (HALLAL et al., 2012; MARCADENTI et al., 2015).

O acúmulo de gordura no tecido adiposo central produz um quadro pró-inflamatório crônico e de baixo grau, trazendo consequências que comprometem a sinalização insulínica e por conseguinte, a homeostase glicêmica. Além disso, quando a capacidade de armazenamento dos adipócitos é excedida, o excesso de lipídeos circulantes deposita-se ectopicamente em tecidos como o fígado e músculo, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento de danos e alterações em estruturas e funções dos respectivos tecidos (DE FRONZO, 2009). Estes lipídeos circulantes quando em excesso podem ligar-se à receptores do tipo *toll like receptor 4* (TLR4), na membrana do tecido adiposo, provocando a liberação celular de citocinas inflamatórias (NEWSHOLME et al., 2012; DEGENS, 2010). Estas citocinas exercem ações parácrinas que perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, induzem resistência insulínica e disfunção vascular e cardíaca. Desta forma, o tecido adiposo possui importante papel no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas associadas à obesidade (LEE, 2013; RICHARDSON et al., 2013; SHIMIZU et al., 2013; BLEAU et al., 2014).

A perda progressiva da sensibilidade à insulina, associada à obesidade, leva à desativação do fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF-1), pela fosforilação inibitória causada por glicogênio sintase kinase-3 β (GSK-3 β) (RUSAI et al., 2013). Este processo desencadeia um prejuízo na expressão das proteínas de choque térmico (*heat shock protein-HSP*) de 70 kDa (HSP70), levando ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da

atividade de quinase como *c-Jun N terminal kinase* (JNK) e *IkkappaB kinase* (Ikk- β), que causam fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) em Ser-307, nos tecidos muscular esquelético e adiposo, interferindo na cascata de sinalização insulínica (KRAUSE et al., 2015a).

Forma-se, portanto, um ciclo vicioso de resistência insulínica, via inflamação, que leva a diminuição progressiva dos níveis de HSP70 intracelular (iHSP70) causando resistência insulínica com tendência a instalação de DM2 (BRUCE et al., 2003; CHUNG et al., 2008; NEWSHOLME et al., 2009; HOOPER e HOOPER, 2009; KRAUSE et al., 2015b).

Com a manutenção do quadro pró-inflamatório a primeira fase do DM2 envolve uma resposta compensatória ao aumento da carga metabólica com elevação na liberação de insulina para manutenção da normoglicemia. Contudo, com a manutenção da resistência insulínica, a doença tende a evoluir para a perda da homeostase glicêmica, com elevação da glicemia de jejum e consequente efeito glicotóxico, que afeta estruturas celulares em diversos tecidos, entre os quais as células β -pancreáticas com perda progressiva da massa total de células e redução da secreção de insulina (KEANE; NEWSHOLME, 2014).

A elevação persistente da glicemia, dos lipídeos circulantes e citocinas inflamatórias desencadeia ainda, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que estão intrinsecamente ligadas à deterioração da sinalização insulínica. Níveis excessivos de ERO podem ocasionar danos celulares diretos, tais como oxidação de lipídios, proteínas e/ou DNA bem como, danos celulares indiretos, por meio da ativação de diversas vias de sinalização intracelulares sensíveis ao estresse oxidativo (EO) como a do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB), que induz a expressão de citocinas inflamatórias. Essa condição pró-inflamatória associada ao EO crônico, pode agravar a disfunção das células β -pancreática, elevando o risco de desenvolvimento de uma síndrome diabética com prejuízo não somente na ação, mas também, na secreção do hormônio insulina (NEWSHOLME; KRAUSE, 2012).

Como fator agravante a resposta celular ao estresse (HSR) está prejudicada em indivíduos diabéticos no músculo esquelético, fígado e células do sistema imune, fato observado pela expressão de HSP70 reduzida (HOOPER et al., 2014). Somado a isso, indivíduos diabéticos sofrem, ao longo do tempo, diminuição de fibras oxidativas, as quais possuem níveis mais elevados de expressão de HSP70, menor síntese de citocinas pró-inflamatórias e uma melhor resposta a ação da insulina (GUPTA et al., 2008). O comprometimento da resposta celular ao estresse pode predispor ao desenvolvimento de danos e agravos em diversos tecidos relacionados ao metabolismo e à progressão da doença e suas complicações.

Neste contexto, o interesse em analisar as alterações relacionadas ao perfil glicídico e lipídico em estágio subclínico, que antecede o desenvolvimento do DM2 vem aumentando exponencialmente. Ensaio clínico randomizado mostraram que a realização de intervenções em pacientes de alto risco de evolução para DM2 foi capaz de reduzir a taxa de progressão da doença. Estas medidas incluem, além do uso de medicações, modificação do estilo de vida com mudanças no padrão alimentar e na atividade física (SBD, 2015).

1.2 Exercício Físico e Obesidade

Descrito pela primeira vez em 1982, o exercício aeróbio de intensidade moderada a alta é capaz de aumentar a produção de ERO (DAVIES et al., 1982). Isso ocorre porque durante a atividade muscular a demanda energética pode superar a de repouso em até 35 vezes, enquanto o consumo de oxigênio pode aumentar de 10 a 15 vezes, sendo que a oxidação de lipídeos atinge seu ponto máximo em torno de 65% do $VO_{2\text{máx}}$ em 30 minutos de exercício (ROMIJN et al., 1993).

Durante a sessão de exercício a lipólise é regulada pela lipase sensível à hormônios, sendo ativada pelo estímulo β -adrenérgico, principalmente pelas catecolaminas (HIRABARA et al., 2006). Juntamente com a oxidação de lipídeos, ocorre o consumo de glicose que, apesar de ser menor em exercícios de intensidade moderada, desempenha efeito importante na manutenção da glicemia. Logo, o exercício agudo ou crônico, de caráter aeróbio moderado, possui um importante papel sobre o metabolismo de glicose e ácidos graxos, pois há uma mobilização de triacilglicerol proveniente do tecido adiposo e/ou de depósitos intramiocelulares, além da captação de glicose plasmática (SILVEIRA et al., 2011; HOOPER et al., 2014).

Para que a musculatura esquelética seja capaz de sustentar a produção de energia pela via oxidativa, a atividade mitocondrial precisa ser adaptada. O treinamento aeróbio promove aumento da biogênese mitocondrial, da atividade de oxidantes, e da densidade vascular, melhorando a perfusão muscular. Desta forma, sua capacidade de oxidação de substratos é ampliada, o que desencadeia um aumento no consumo de oxigênio (O_2). Este conseqüentemente levará a uma maior produção de ERO, pois aproximadamente 5% deste O_2 não será reduzido completamente à H_2O na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons durante a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (SILVEIRA et al., 2011).

As ERO podem ser radiculares, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e a hidroxila (OH^{\bullet}), sendo que o $O_2^{\bullet-}$ pode ser convertido em uma espécie não radicalar, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ERO reagem oxidando moléculas lipídicas, proteicas e até mesmo o DNA, na tentativa de se reduzir/estabilizar (FANG; YANG; GUOYAO, 2002; KOHEN; NYSKA, 2002).

Para a manutenção da homeostasia do estado redox e das estruturas celulares, se faz necessária a ação de mecanismos de defesa para a inativação das ERO excedentes. O sistema de defesa antioxidante do organismo é formado por agentes classificados como enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Entre os não enzimáticos endógenos, a glutathione reduzida (GSH) é o principal agente (RETH, 2007). A SOD é responsável por dismutar o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , o qual é substrato para as enzimas CAT e/ou GPx que convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 . O exercício aeróbio moderado regular promove, de forma adaptativa, um aumento na expressão e na atividade destas enzimas antioxidantes a fim de manter a homeostase do estado redox do organismo.

A produção de ERO não pode ser relacionada apenas a processos deletérios, pois elas também possuem um papel de sinalização benéfica no meio intracelular. O aumento de suas concentrações está associado à elevação dos níveis de adenosina monofosfato (AMP) durante o exercício físico, estes sinalizam a ativação da enzima adenosina monofosfato quinase (AMPK) para estimular o catabolismo de substratos na produção *de novo* ATP (SANTOMAURO JR et al., 2008). A AMPK é responsável pela regeneração dos níveis de ATP através da oxidação de ácidos graxos e glicose (LENZ; SEYER, 2013).

Na musculatura esquelética, a AMPK contribui para manutenção da normoglicemia por meio da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana durante os primeiros 30 minutos após o exercício (retornam a seus valores basais 2 horas após o término da sessão de exercício), elevando desta forma a captação celular de glicose (GOODYEAR et al., 1990); e pela redução da resistência muscular à insulina (SANTOMAURO JR. et al., 2008), por diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. As concentrações de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, encontram-se reduzidas em indivíduos obesos e, portanto, tratamentos que possam aumentá-la, como o exercício físico, são capazes de melhorar a sensibilidade à insulina do músculo esquelético e evitar a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, bloqueando os efeitos deletérios da obesidade (HONG et al., 2009).

Contribuindo para os efeitos anti-inflamatórios do exercício, durante a sessão de exercício, são ativados, nas células musculares, HSF1, que controla a expressão de genes que codificam a HSP70 (MORIMOTO, 1993; SANTORO, 2000). A maior expressão de HSP70 causa inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias por meio da inativação do NFκB (ASEA; DE MAIO, 2007) e por efeitos anti-inflamatórios diretos (KNOWLTON, 2006), pois a maior expressão desta proteína causa inibição da fosforilação de JNK, e deste modo, evita a fosforilação do IRS-1 em Serina, favorecendo a cascata de sinalização insulínica, diminuindo a resistência à insulina (CHUNG et al., 2008).

Em indivíduos saudáveis, na resposta ao estresse, há a indução de expressão gênica para a transcrição de RNAm HSP72 (forma induzível de HSP70) no músculo, o que aumenta 6,5 vezes após 2 horas da sessão de exercício, mantendo-se elevada por até 8 horas (WALSH et al., 2001). Em indivíduos obesos e com DM2 esta resposta encontra-se prejudicada, ou seja, a expressão da HSP70 está diminuída em fibras musculares esqueléticas (RODRIGUES-KRAUSE et al., 2012), o que sugere que a expressão de HSP70 é fator fundamental para a sensibilidade insulínica.

1.3 Terapia Térmica e Obesidade

Os estudos utilizando esta terapia térmica são realizados em grande parte empregando modelos animais, contudo alguns ensaios já foram executados com humanos, não obstante a diferença no grau de hipertermia induzido. De modo geral, os achados em modelos experimentais assim como em humanos, sugerem que esta terapia apresenta efeitos promissores no tratamento da obesidade e DM2.

Similarmente ao efeito do exercício físico, a elevação da temperatura corporal também é capaz de aumentar a expressão de HSP72 nos tecidos muscular esquelético, hepático e adiposo por até 24 horas após o aumento da temperatura (CHUNG et al., 2008). Ensaios clínicos randomizados que submeteram indivíduos com síndrome metabólica à combinação de estimulação elétrica leve e choque térmico, mostram efeitos benéficos desta terapia combinada sobre a adiposidade visceral e nos valores de glicemia e hemoglobina glicada, além de produzir efeitos anti-inflamatórios, associados ao aumento da expressão de HSP70 (KONDO et al., 2014).

A terapia térmica, uma prática regular realizada por meio do uso de sauna e banhos quentes de imersão, também tem sido associada com benefícios para indivíduos com doenças metabólicas, como obesidade e diabetes mellitus, não obstante terem sido apontados riscos desta terapia em certas condições, como de doenças cardiovasculares e em idosos (HOOPER, 1999; MORINO et al., 2008; KONDO et al., 2010; KONDO et al., 2012; HOOPER et al., 2014; MATSUYAMA et al., 2014; KRAUSE et al., 2015b).

Investigações realizadas com animais obesos (induzidos por dieta hiperlipídica) evidenciam que a terapia de choque térmico produz melhora na tolerância à glicose por restaurar seu transporte estimulado por insulina, uma vez que a sensibilidade à insulina no músculo esquelético é aumentada, protegendo-o do desenvolvimento da resistência insulínica. Esses efeitos foram associados ao aumento da expressão de HSP70 (GUPTE et al., 2008). Em modelos animais com diabetes induzido por estreptozotocina a terapia de choque térmico (41° por 30 minutos) foi capaz de melhorar o perfil lipídico, a capacidade antioxidante e a secreção de insulina (BATHAIE et al., 2010). Em ensaios realizados com pacientes diabéticos foi observado que a terapia de banho quente (*hot-tub therapy*) reduziu em 18% a dose de insulina utilizada/necessária, preveniu a hipoglicemia, reduziu o peso corporal, a glicemia em jejum e as concentrações de hemoglobina glicada (HOOPER, 1999).

A adoção de terapias complementares, como a terapia térmica (utilização de saunas ou a imersão em banhos quentes), também podem trazer benefícios adicionais para a saúde dos indivíduos, em especial obesos e diabéticos (KRAUSE et al., 2015b), por meio da maior expressão celular de HSP70. Nesta proposta de trabalho propomos associá-la ao exercício a fim de potencializar os efeitos benéficos do exercício físico.

Desta forma, os mecanismos deflagrados pela terapia térmica sobre a melhora na sinalização insulínica já são em boa parte descritos (CHUNG et al., 2008), como a inibição de kinases pró-inflamatórias, por meio do aumento da expressão de HSP70 intracelular. A terapia térmica é capaz de mimetizar parte dos efeitos do exercício físico, que é considerado hoje uma das melhores opções para o tratamento das alterações metabólicas provenientes da obesidade para pacientes capacidades funcionais mantidas, e com alto risco de desenvolvimento de DM2 (HOOPER et al., 2014).

Estudos em humanos evidenciam que a associação de estímulos musculares por eletrodos com o choque térmico potencializa a melhora em parâmetros como a inflamação, glicemia, dislipidemia, obesidade central e sinalização da insulina (KONDO et al., 2014). Não obstante o exercício físico seja o tratamento não farmacológico mais eficaz na atualidade no

combate a obesidade, ele não pode ser prescrito para todos os indivíduos portadores desta patologia (HOOPER et al., 2014). Desta forma, a terapia térmica mostra-se um importante substituto e potencializador dos efeitos do exercício. Porém, ainda não estão claros os efeitos isolados da terapia térmica sobre o perfil hematológico e oxidativo, sendo necessária sua investigação, principalmente pelo fato de que na obesidade todas estas variáveis encontram-se em um estado progressivo de dissonância.

Por outro lado, diversos estudos têm mostrado que a HSP70 é secretada para o ambiente extracelular (eHSP70) proveniente de células do sistema imunológico, como linfócitos T (HUNTER-LAVIN et al., 2004; IRELAND et al., 2007; HECK, 2011) atingindo a circulação sanguínea, na qual seu papel parece envolver especialmente ações imunorregulatórias, pró-inflamatórias e sinalizadoras de dano ou risco de dano celular (WILLIAMS et al., 2007). As concentrações de eHSP70 encontram-se elevadas em pacientes obesos (KRAUSE et al., 2015), e com níveis ainda maiores em obesos que desenvolveram do DM2 (RODRIGUES-KRAUSE et al., 2012), gerando assim um processo inflamatório sistêmico e crônico. Este processo inflamatório retroalimenta a resistência periférica a insulina e vice-versa. Neste contexto ainda é importante elucidar as alterações nesta proteína quando o organismo é exposto a tratamentos não farmacológicos como o exercício aeróbico e o choque térmico.

Além disso, a relação entre HSP70 plasmática (eHSP70) e nos linfócitos (iHSP70) mensura a habilidade do sistema imunológico na manutenção do equilíbrio pró-inflamatório (células Th1) e anti-inflamatório (células Th2), sobretudo em resposta ao exercício físico (SCHOLER, 2011; HECK et al., 2011). O desbalanço entre as concentrações extra e intracelular de HSP70 (razão [eHSP70] / [iHSP70]), a favor da primeira, pode ser um importante indicador do estado pró-inflamatório crônico na obesidade associado com a resistência à insulina e desenvolvimento do DM2 (KRAUSE et al., 2015a).

Além da investigação acerca dos efeitos agudos do exercício físico leve e do choque térmico, é pertinente investigar o potencial da associação entre exercício aeróbico com choque térmico na produção de benefícios a saúde do indivíduo obeso, nem sempre alcançados com o uso das intervenções isoladas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito agudo do choque térmico e de sua associação com exercício aeróbico leve sobre a resposta ao estresse, perfil inflamatório, redox, metabólico e hematológico em animais obesos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Induzir a obesidade e intolerância à glicose por meio do tratamento com dieta hiperlipídica (fase metodológica).
2. Avaliar o efeito agudo do choque térmico, do exercício aeróbico leve e da associação de ambas intervenções sobre:

- a resposta celular ao estresse, nos parâmetros de iHSP70 em tecidos insulino-dependentes;
 - a concentração de eHSP70;
 - o grau de lipoperoxidação em tecidos insulino-dependentes;
 - o perfil metabólico, nos parâmetros lipídico e glicídico;
 - os parâmetros hematológicos gerais.
3. Calcular o valor do índice H com base na razão [eHSP70/iHSP70] para avaliação do status imunoinflamatório.

3 ARTIGO

A COMBINAÇÃO DO EXERCÍCIO LEVE COM CHOQUE TÉRMICO NÃO MODIFICA A RESPOSTA AO ESTRESSE, MAS FAVORECE A HOMEOSTASE LIPIDÊMICA.

Analú Bender dos Santos^{1,2}, Thiago Gomes Heck^{1,2}, Mirna Stela Ludwig^{*1,2}

¹ Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GpeF, Departamento de Ciências da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

² Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

* Autor correspondente:

Mirna Stela Ludwig (PhD)

ludwig@unijui.edu.br

Rua do Comércio, 3000

Departamento de Ciências da Vida

Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

Ijuí, RS, Brasil

CEP: 98700-000

Resumo

A obesidade está associada a um contexto multicausal no qual participam fatores genéticos e ambientais. O estilo de vida contemporâneo produziu importantes modificações no padrão alimentar e no nível de atividade física da maior parte da população. O acúmulo de gordura no tecido adiposo central produz um quadro pró-inflamatório crônico e de baixo grau, trazendo consequências que comprometem a sinalização insulínica. A perda progressiva da sensibilidade à insulina, associada à obesidade, desencadeia um prejuízo na expressão de HSP70. No meio intracelular (iHSP70) possui função *chaperona* e anti-inflamatória, enquanto que no meio extracelular (eHSP70) desempenha o papel pró-inflamatório e de sinalização imunoinflamatória. Um desequilíbrio na razão eHSP70/iHSP70 (índice H), a favor da primeira, favorece um estado pró-inflamatório. A HSP70 é expressa sob diferentes condições de estresse, entre ela o exercício e a elevação da temperatura, os quais são utilizados com estratégias de prevenção e melhora no quadro inflamatório e oxidativo gerado pela obesidade. Entretanto, os efeitos agudos e crônicos da combinação de ambas condições de estresse em organismos obesos ainda não foram investigados. O presente estudo propõe investigar os efeitos agudos da combinação do exercício físico com o choque térmico, bem como das intervenções isoladamente, sobre a expressão de iHSP70, o estado redox, sobre o *status* imunoinflamatório, por meio do índice H (razão eHSP70/iHSP70), e sobre o perfil metabólico e condições hematológicas, em modelo experimental de obesidade e resistência insulínica. Para tanto, foram utilizados 50 ratos Wistar adultos, dos quais 26 foram submetidos a dieta hiperlipídica e 24 tratados a dieta padrão, pelo período de 12 semanas. Após este período os animais foram divididos em 8 grupos experimentais, distribuídos de acordo com as intervenções de exercício aeróbio leve, choque térmico e combinação de ambas intervenções. Os resultados indicam que o exercício e o choque térmico, agudamente, promovem resposta de citoproteção

tecido-dependente e influenciada pela condição de obesidade, e de que a associação do exercício com choque térmico potencializa a resposta imunoinflamatória apenas em animais magros e favorece um melhor controle sobre o perfil lipídico em animais obesos.

Palavras-chave HSP70. Obesidade. Índice H. Exercício. Choque Térmico.

Abreviações

DM2	Diabetes mellitus tipo 2
eHSP72	HSP72 extracelular
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GTT	Teste de Tolerância à Glicose
HTT	<i>Hot-tube Therapy</i>
HSP70	Proteína de Choque Térmico de 70 kDa
iHSP70	HSP70 intracelular
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
TG	Triglicerídeos
TLR 4	Receptores do tipo <i>Toll Like 4</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α

Introdução

Para que um organismo seja capaz de sobreviver é necessário possuir a capacidade de responder a diversas formas de estresse fisiológico e ambiental (Guisbert and Morimoto 2013). Um dos mecanismos de resposta celular ao estresse se dá pelo aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSPs), dentre as quais destaca-se a HSP70 (família de proteínas de choque térmico de 70 kDa), que permanece conservada ao longo da evolução dos seres vivos e se encontra em elevada concentração nos seres eucariontes. Estas proteínas possuem várias isoformas e, dependendo do compartimento celular no qual se encontram, desempenham diferentes funções. Dentre elas destaca-se a forma induzível de 72 kDa (HSP72), com expressão aumentada sob processos de estresse celular (Mayer and Bukau 2005; Heck et al. 2017). Como chaperona, a HSP70 possui papel essencial na proteostase (Hu et al. 2006), além de exercer importante função anti-inflamatória e antioapoptótica (Richter-Landsberg 2007) no ambiente intracelular (iHSP70). Além disso, o aumento da expressão de iHSP70 inibe a fosforilação de JNK, diminuindo a resistência à insulina no tecido muscular (Chung et al. 2008). O aumento na expressão de iHSP70 está associada com alterações metabólicas como o aumento do número de mitocôndrias musculares, a diminuição de triacilglicerol muscular, da massa de tecido adiposo epididimal (Henstridge et al. 2014), da glicemia e da insulinemia de jejum, além de melhorar a resposta ao teste de tolerância à glicose (Gupte et al. 2009).

O exercício físico é capaz de aumentar a concentração de iHSP70 em até 6,5 vezes, por até 8 horas após a sessão de exercício, o que traz benefícios metabólicos como o aumento da sensibilidade insulínica, da captação celular de glicose, da oxidação de ácidos graxos e da lipólise em adipócitos e depósitos ectópicos (músculo e fígado) (Walsh et al. 2001). Semelhantemente aos efeitos produzidos pelo exercício sobre a regulação glicêmica, a terapia de choque térmico, que consiste em submeter o indivíduo a banhos de imersão em água quente (*hot tube therapy* – HTT), produz melhora na sensibilidade à insulina, no percentual de hemoglobina glicada (HbA1c) e na

glicemia de jejum, bem como, no perfil inflamatório pela inibição da transcrição nuclear de NF- κ B (Hooper 1999; Chung et al. 2008; Hooper et al. 2014; Krause et al. 2015c).

As HSP70 são também encontradas no meio extracelular (eHSP70), onde desempenham função imunoinflamatória em situações de estresse (Heck et al. 2017). Estudos com seres humanos, indicam que em condições de obesidade e DM2, a concentração plasmática de eHSP70 está aumentada, levando ao agravamento da resistência à insulina e a piora do quadro de inflamação crônica de baixo grau (Krause et al. 2015b). Os níveis de eHSP70 também são estudados como biomarcadores da severidade de doenças e desfechos clínicos em doenças cardiovasculares. Considerando a dualidade de funções de acordo com sua localização, a razão eHSP70/iHSP70 (Índice H) tem sido sugerida como importante marcador do *status* inflamatório e como um índice clinicamente relevante no prognóstico de doenças e distúrbios metabólicos (Krause et al. 2015b; c; Heck et al. 2017)

Neste contexto, pressupõe-se que a terapia térmica possa reproduzir, em parte, os efeitos do exercício sobre a resposta celular ao estresse, como alternativa para indivíduos com capacidade física limitada em razão do agravamento da obesidade e diabetes, e que a combinação das terapias (exercício e terapia de choque térmico) pode ainda gerar mais efeitos benéficos ao organismo diabético. Assim, investigamos, comparativamente, os efeitos agudos do choque térmico e do exercício aeróbio leve, e da combinação de ambas intervenções, sobre a expressão intracelular de HSP70 (iHSP70), sobre parâmetros metabólicos e hematológicos, e na razão eHSP70/iHSP70 (Índice H), em ratos obesos.

Métodos

Animais

Foram utilizados 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos com 12 semanas de idade, provenientes do biotério da UNIJUI. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura ambiente de 22±2°C, alimentados *ad libitum* com ração comercial padrão para ratos de laboratório, NUVILAB, ou ração hiperlipídica produzida no Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUI, com livre acesso a água.

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais (Hoff 1980), e do Código Brasileiro de Experimentação Animal – 1988, em conformidade com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH). O projeto de pesquisa encontra-se APROVADO junto à Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA, da UNIJUI, conforme PARECER CONSUBSTANCIADO N°. 001/2015 (ANEXO 2).

Delineamento Experimental

Inicialmente 26 ratos foram submetidos a 12 semanas de consumo de ração hiperlipídica (grupo Obeso) e 24 ratos, a ração comercial padrão (grupo Magro). Neste período foram realizados os seguintes procedimentos: registro do consumo de ração; teste de tolerância à glicose (GTT), teste de tolerância a insulina (ITT), avaliação de variáveis antropométricas: peso corporal, IMC, gordura visceral e índice de adiposidade.

A obesidade e a tolerância à glicose do grupo de animais Obesos (submetidos a DHL por 12 semanas) foram confirmadas antes da realização das intervenções (exercício, choque térmico e combinação de exercício e choque térmico), ao final de 12 semanas de dieta. Os grupos de animais obesos (O) apresentaram aumento da glicemia de jejum (ver Tabela S3 em Material Suplementar) e intolerância à glicose (ver Figura S2-C e D em Material Suplementar). Os animais não apresentaram alterações na resposta ao ITT (ver Figura S2- A e B em Material Suplementar). Na tabela S1, os dados referentes às variáveis biométricas (peso corporal final, IMC, gordura visceral, índice de adiposidade) e de eficiência energética (ganho de peso/consumo de ração) confirmam o modelo experimental de obesidade.

Após a 12ª semana todos os animais foram adaptados a caminhada na esteira, adaptada para roedores (Nunes et al. 2008), por cinco dias consecutivos. A seguir, após 2 dias sem nenhuma manipulação (apenas mantidas as dietas experimentais) os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n = 5-8/grupo):

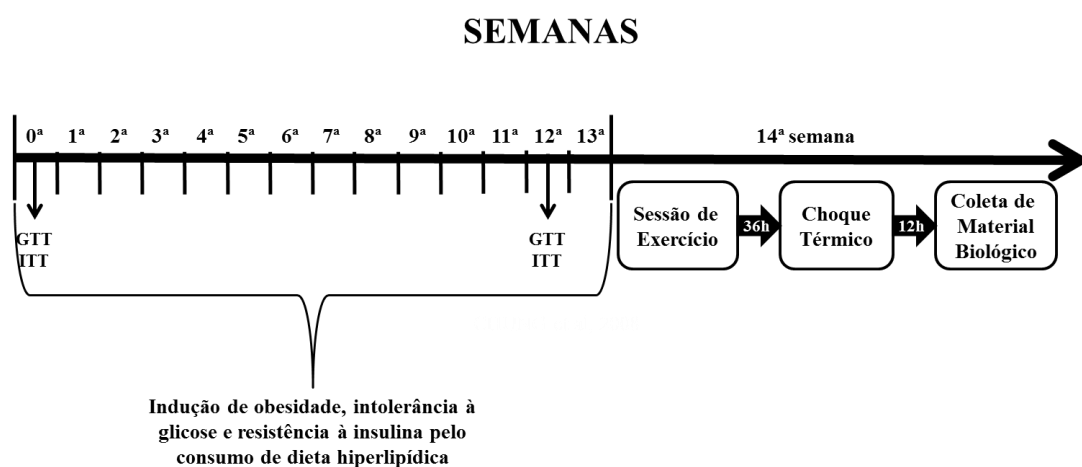


Figura 1. Delineamento experimental.

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupos		Intervenções
Magro (Dieta Padrão)	Obeso (Dieta Hiperlipídica - DHL)	
M	O	Mantidos em repouso
M+E	O+E	Submetidos ao exercício (20 min a 8 m/min)
M+HS	O+HS	Submetidos ao choque térmico (15 min à 41-41,5°C)
M+E+HS	O+E+HS	Submetidos ao exercício e ao choque térmico (20 min a 8 m/min) e (15 min à 41-41,5°C) em dias separados

Os animais dos grupos M+E, M+E+HS, O+E e O+E+HS realizaram uma sessão de exercício na velocidade de 8 m/min., enquanto os grupos M, M+HS, O e O+HS permaneceram em repouso. 36h após a sessão de exercício, os grupos M+HS, M+E+HS, O+HS e O+E+HS passaram por uma sessão de choque térmico, enquanto os grupos M, M+E, O e O+E permaneceram normotérmicos. Em seguida, 12 horas após a sessão de choque térmico, todos os animais foram mortos por decapitação para a coleta de material biológico para posterior análise biomolecular.

Procedimentos

Dietas

O grupo Magro recebeu ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1), comercialmente obtida a partir de Nuvital Nutrientes S.A. (total de energia metabolizável: 16,6 MJ / kg, sendo 11,4% gorduras, 62,8% carboidratos e 25,8% proteínas). O grupo obeso recebeu ração hiperlipídica a base de banha de porco (energia metabolizável total: 22,8 MJ / kg, sendo 58,3 % de gorduras, 24,5% carboidratos e 17,2% de proteínas). Todos os ingredientes da ração hiperlipídica (exceto carboidrato e banha de porco) foram ajustados para estarem presentes na mesma proporção que no grupo controle (Krause, Bock, et al. 2015). Esta ração foi armazenada em refrigerador (2-8°C). O consumo de ração foi acompanhado semanalmente, pela relação entre a oferta e o consumo por caixa: [(oferta total – sobra total) / número de animais] (Goettems-Fiorin et al. 2016). A eficiência energética foi calculada pela divisão do ganho de peso (g) pelo consumo total (Kcal), e o resultado multiplicado por 10³. Expresso em (g/Kcal)x10³ (White et al. 2013) (ver Tabela S1 em Material Suplementar)

Perfil Biométrico

O perfil biométrico dos animais foi avaliado após a 13ª semana de consumo da ração hiperlipídica, após anestesia, antes da sessão de choque térmico. Primeiramente, foram realizadas as medidas do comprimento naso-anal e pesagem dos animais. Os tecidos estudados (tecido adiposo branco epididimal, muscular esquelético-gastrocnêmio, hepático) foram coletados integralmente e pesados imediatamente (ao final do período de tratamento, após a morte dos animais), para estabelecimento da relação entre o peso dos tecidos e o peso corporal total, em termos percentuais. As porções de tecido adiposo epididimal foram dissecadas bilateralmente e pesadas individualmente. O índice de adiposidade foi calculado para cada rato da seguinte forma: 100 x [(soma dos pesos das porções de tecido adiposo, g) / (peso corporal total, g)]. Expresso em percentual (%) (Taylor and Phillips 1996; Leopoldo et al. 2016). A adiposidade foi avaliada por meio do % do tecido adiposo branco abdominal em relação ao peso corporal total (Tabela S1. Ver material suplementar). O índice de massa corporal foi calculado para cada rato da seguinte forma: 100 x [(peso corporal total, g) / (comprimento corporal, naso-anal, cm)²]. Expresso em (g/cm²)x100 (Taylor and Phillips 1996).

Exercício

Após 12 semanas de consumo de ração hiperlipídica e antecedendo a sessão de exercício, todos os animais passaram por um período de adaptação à esteira rolante durante 5 dias consecutivos, aumentando progressivamente e diariamente, o tempo 5-10min e a velocidade da esteira, até atingir ~ 4m / min. Foi realizada uma sessão de exercício aeróbio leve, na velocidade de ~8 m/minuto com a duração de 20 minutos em esteira rolante sem inclinação. A esteira possui 8 raias individuais (Gava et al. 1995).

Choque Térmico

A sessão de choque térmico ocorreu ~36h após a sessão de exercício. Para tanto, os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg.kg-1 (0,05 mL de xilazina 2% para 100 g de rato) e cetamina 90 mg.kg-1 i.p. (0,09 mL de cetamina 10% para 100 g de rato) para supressão do controle da temperatura e posterior indução da hipertermia. Estes animais foram colocados em um recipiente (banho) com água a 42 °C, com a maior parte do corpo

submerso (exceto cabeça e membros anteriores). A temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal durante todo o período em que eles estiveram no banho. Tão logo apresentaram temperatura central de 41 °C permaneceram no banho, com monitoramento contínuo da temperatura central (41-41,5 °C) e do banho (41-42°C), durante quinze 15 minutos (Chung et al. 2008; Bathaie et al. 2010). Os animais dos grupos não submetidos ao choque térmico (grupos M, M-E, O e O-E) também foram anestesiados, porém mantidos com temperatura central entre 36,5-37,5 °C, monitorada com termômetro retal, em um recipiente com água (banho). Após o período de indução da hipertermia, os animais permaneceram no laboratório, mantidos na temperatura ambiente de 22-24 °C, até recuperação da anestesia para posterior hidratação com solução fisiológica (~3 mL / animal), sendo em seguida levados ao biotério, em ambiente de experimentação, no qual foram mantidos em condições ideais.

Teste de Tolerância à Glicose

Os testes de tolerância à glicose (GTT) foram realizados nos grupos experimentais em diferentes momentos de tratamento, ou seja, no tempo zero (antes de qualquer intervenção) e na 12ª semana de intervenção com a ração hiperlipídica. Os testes foram realizados com os animais em jejum de 12 horas. Para tanto, foi preparada uma solução de glicose na concentração de 80% (m/v), administrada na dose de 1g/kg, por injeção via intraperitoneal (IPGTT). Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por, no mínimo, 30 minutos (tempo zero) e nos tempos de 30 e 120 minutos após a administração da solução de glicose. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na parte distal da cauda dos animais, usando aparelho de leitura glicêmica capilar, glicosímetro, Optium Xceed da Abbott (Figura S2 A e C– ver material suplementar). A área sob a curva relativa a curva de resposta glicêmica foi calculada geometricamente através da aplicação da regra trapezoidal (Usa Fao 1997) (Figura S2 B e D. Ver material suplementar).

Teste de Tolerância à Insulina

Os testes de tolerância à insulina (ITT) foram realizados nos grupos experimentais em diferentes momentos de tratamento, ou seja, no tempo zero (antes de qualquer intervenção) e na 12ª semana de intervenção com a ração hiperlipídica. Os testes foram realizados com os animais alimentados. Para a realização do ITT foi utilizada a Insulina Humalog Lispro – Lilly 100 UI/mL, diluída em PBS pH 7,4 (NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH₂PO₄ (0,9 mM), Na₂HPO₄ (6,4 mM)) na concentração de 1UI/mL, e aplicada na dose de 1UI/kg de peso corporal, injetada via intraperitoneal (IPITT). Os volumes administrados foram de 100 µL para cada 100 g de peso corporal. Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia que antecede a aplicação da insulina, com os animais alimentados, foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (tempo zero) e nos tempos de 30 e 120 minutos após a injeção da solução de insulina. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na parte distal da cauda dos animais, usando aparelho de leitura glicêmica capilar, glicosímetro, Optium Xceed da Abbott (Figura S2. Ver material suplementar).

Morte dos Animais

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos, para posterior realização das análises. O método escolhido para morte baseia-se no fato deste

não produzir alterações fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando-se a necessidade de realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância pode ser administrada nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos experimentos porque todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown et al. 2005; Xia et al. 2005). Além disso, esses anestésicos interferem em diferentes funções das células, como às envolvidas na produção de proteínas de choque térmico (Chang et al. 2005), cuja expressão é uma das principais variáveis do estudo. Os animais foram decapitados em ambiente exclusivamente destinado à morte dos animais, com exaustão e higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Ensaio Biológicos, sob supervisão de médico veterinário (responsável pelo Biotério-UNIJUI). Após a morte, os animais foram dissecados para coleta dos tecidos e, para o descarte, foram colocados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20 °C) destinado para este objetivo, no próprio Laboratório de Ensaio Biológicos. Seguindo o cronograma da Instituição até ser entregue ao serviço terceirizado de coleta de resíduos da UNIJUI, realizado pela empresa Stericycle, de Santa Maria-RS.

Preparo das Amostras

Os tecidos adiposo visceral (epididimal), hepático, muscular (gastrocnêmio) foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer até o momento da preparação para as diferentes análises. O sangue troncular foi coletado em amostras distintas conforme as especificações exigidas pelos fabricantes para a obtenção de sangue total, plasma e soro, sendo centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente em centrífuga hematológica. O sangue total para a hematologia foi diluído em solução fisiológica, na proporção 1:4. O plasma e/ou soro utilizado nas análises bioquímicas foram preparados conforme as especificações dos manuais dos respectivos kits para análise de lipídeos e HSP70.

Análises Moleculares, Bioquímicas e Hematológicas

Concentração plasmática de HSP72 (eHSP72)

O sangue foi coletado em tubos contendo ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) [2mg/mL]. Após centrifugação, o plasma foi armazenado congelado contendo inibidor de protease (PMSF - Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila; Sigma P7626, 1,74 mg/mL = 100 mM). Os níveis plasmáticos de eHSP70 foram medidos utilizando Kit específico para HSP72 (High Sensitivity Elisa Kit - Enzo Life Sciences EKS-715) em leitora de microplacas conforme instruções do fabricante (450 nm).

Expressão de HSP70 (iHSP70)

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas para mensurar expressão de iHSP70, por Western blot (Laemmli 1970). As amostras passaram por separação proteica de acordo com peso molecular (kDa) por meio de eletroforese, e a seguir as amostras passaram por eletrotransferência para membrana de PVDF e imunodeteção com anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147; diluído 1:1000), e anticorpo monoclonal anti-β-actina (Sigma A3854, diluído 1:5000) para normalização. As proteínas fixadas na membrana de PVDF e identificadas pelos anticorpos foram reveladas por quimiluminescência em filme fotográfico (Amersham Hyperfilm ECL; GE, Health Care) após incubação da membrana em solução ECL (GE, Health Care). As imagens referentes à

expressão de iHSP70 e actina foram quantificadas com o programa ImageJ, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias de HSP70/ β -actina.

Índice H - *Status* imunoinflamatório

O índice H pode ser mensurado relacionando as concentrações de eHSP70 plasmáticas com suas concentrações em diferentes tecidos (iHSP70) para indicar o *status* imunoinflamatório de um indivíduo diante de estressores ambientais (Goettems-Fiorin et al. 2016), disfunções metabólicas ou de desafios como o exercício e o choque térmico (Bock et al. 2016; Heck et al. 2017). Para o cálculo do Índice H, considera-se $R_c = [eHSP70]_c / [iHSP70]_c$ como a razão de HSP70 em uma situação controle, quaisquer que sejam as técnicas utilizadas para avaliar as concentrações de eHSP70 e iHSP70. Assim, o Índice H pode ser calculado como o quociente de $R_j = [eHSP70]_j / [iHSP70]_j$ por R_c (R_j / R_c), que será considerado unidade normalizadora ($R_c = 1$) de todos os resultados remanescentes nessa situação “j”. Portanto, o Índice H = R_j / R_c , permite a comparação entre qualquer situação estressante “j” e a situação assumida como o controle “c”. O Índice H pode ser aplicado para estimar o balanço imunoinflamatório em diversas situações imunológicas (Goettems-Fiorin et al. 2016; Schöler et al. 2016; Heck et al. 2017).

Tabela 2. Classificação do Índice H

Faixa	Descrição	Intensidade do desafio
0-1	Valores fisiológicos	Fraco
>1-5	Resposta imunoinflamatória	Moderado
>5	Resposta pró-inflamatória	Intenso

Lipoperoxidação

A determinação da lipoperoxidação foi realizada utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege, Aust 1978), como medida dos parâmetros de estresse oxidativo, por espectrofotometria à 535 nm (Zanchi et al. 2008). Os valores são relativos a concentração de malondialdeído (MDA) / mL de plasma ou por mg de proteína (tecidos).

Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada por espectrofotometria à 595nm, usando albumina sérica bovina como padrão (pontos de 0,04-5,0 mg/mL). Os resultados obtidos foram expressos em mg de proteínas por ml de amostra (Bradford 1976).

Triglicerídeos e Colesterol

As dosagens de Triglicerídeos e Colesterol foram realizadas por metodologia enzimático-colorimétrico, utilizando kits da Bioclin – Quibasa através da automação BS200- Mindray, para tal foram utilizados aproximadamente 200 μ L de soro por animal e 500 μ L de reagente para cada análise realizada. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Hemograma

O sangue foi coletado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) [2mg/mL]. Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico ABX Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante. Através desse equipamento é possível obter os seguintes parâmetros: contagem total de hemácias (RBC), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB); contagem de leucócitos, além da contagem de plaquetas (Horiba- Manual do usuário). As amostras foram diluídas em solução fisiológica na proporção 1:4. Após, foram realizadas distensões hematológicas em lâmina, corados com coloração panótica (Newprov) e analisadas por profissional com experiência na área, para cada lâmina uma contagem diferencial de 100 leucócitos (Tabela S3. Ver material suplementar).

Análise Estatística

As variáveis em estudo foram avaliadas quanto a sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados são apresentados como média \pm DP, sendo a variável eHSP72 normalizada com log 10. As variáveis ASC, IMC, índice de adiposidade, consumo de ração, peso, eficiência energética foram analisadas pelo Teste *t* não pareado. A glicemia de jejum foi avaliada pelo Teste *t* não pareado. Foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguidas do pós-teste de Sidak as variáveis GTT e ITT. Todas as demais variáveis foram analisadas por ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de *Tukey*. Nível de significância com um $P < 0,05$.

Resultados

Uma sessão de exercício aumentou os níveis de iHSP70 no tecido muscular em animais magros (M+E vs M) e em obesos (O+E vs O), sendo maior nos obesos (M+E vs O+E) (Figura 2A). O exercício causou aumento nos níveis de iHSP70 no tecido adiposo comparativamente ao efeito do choque térmico e ao efeito da combinação de exercício com choque térmico, porém, somente em animais obesos (O+E vs O+HS e O+E+HS) (Figura 2B). O choque térmico isolado elevou a concentração de iHSP70 no tecido muscular gastrocnêmio somente em animais obesos (O+HS vs O). A combinação de exercício com choque térmico produziu aumento na concentração de iHSP70 muscular somente em animais magros (M+E+HS vs M) (Figura 2A). Não foi observado modificação na concentração de iHSP70 no tecido hepático (Figura 2C).

Uma sessão de choque térmico, isolada (M+HS) e em associação com o exercício (M+E+HS), elevou os níveis de eHSP72 em 173% e 150%, respectivamente (Figura 2D), em animais magros, comparativamente ao respectivo grupo controle (M). O efeito da combinação de exercício e choque térmico sobre a concentração de eHSP72 difere entre os animais magros e obesos (M+E+HS vs O+E+HS). O exercício e o choque térmico, isolados ou associados, não causaram alteração na concentração plasmática de eHSP72 nos animais obesos (Figura 2D).

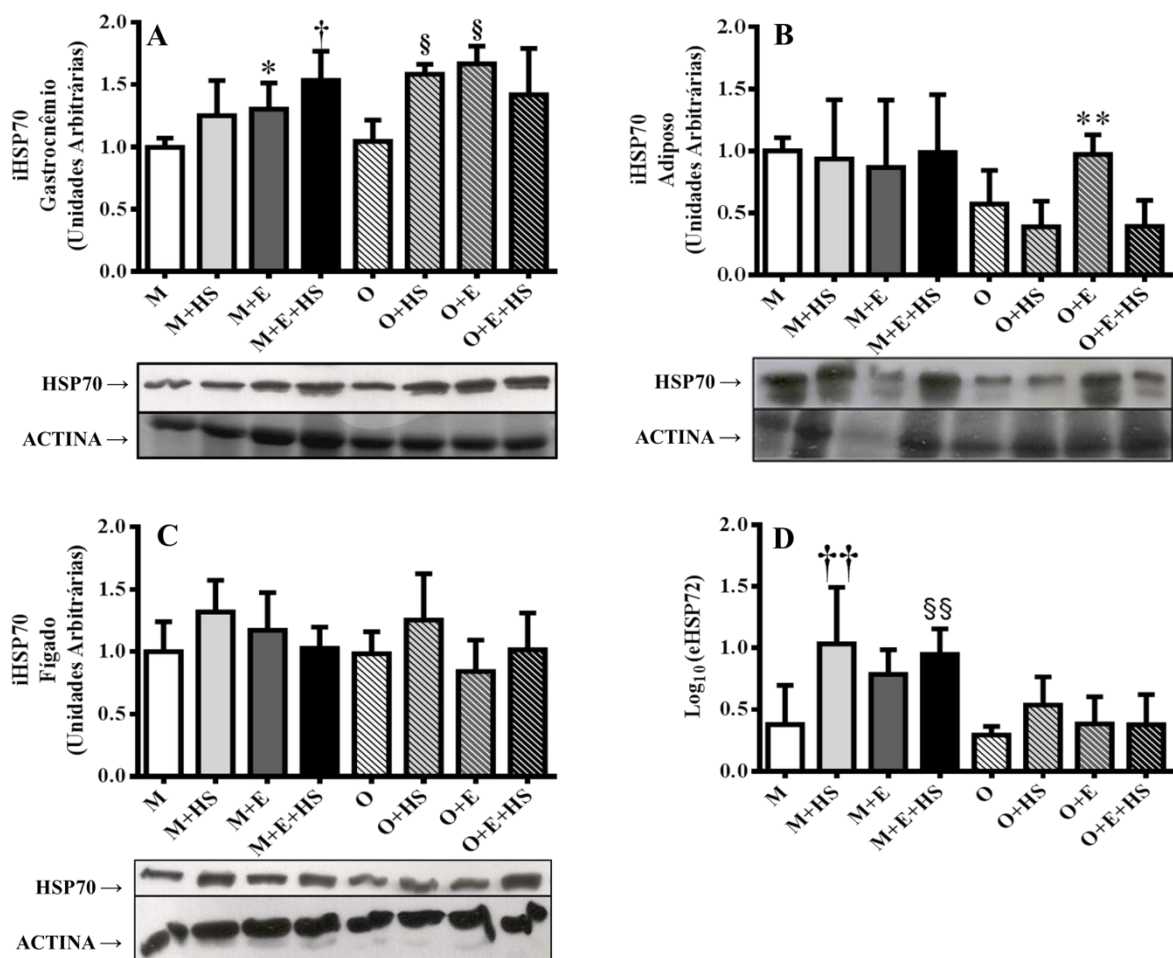


Figura 2. Concentração de iHSP70 no músculo gastrocnêmio (A), no tecido adiposo epididimal (B) e no fígado (C). Concentração de eHSP70 plasmática (D). Os dados estão expressos como média \pm DP. Análise estatística por Anova de uma via seguida do pós-teste de Tukey. **A)** * $P < 0,05$ vs M, O+E. † $P < 0,05$ vs M. § $P < 0,05$ vs O, N=3-5 por grupo. **B)** ** $P < 0,05$ vs O+HS, O+E+HS, N=4-6 por grupo. **C)** $P = 0,1115$ N=4-6 por grupo. **D)** †† $P < 0,002$ vs M. §§ $P < 0,002$ vs M, O+E+HS. N=4-7 por grupo.

As intervenções de exercício e de choque térmico, isoladas ou associadas, não promoveram modificações na lipoperoxidação muscular (Figura 3A) em animais magros e obesos. A intervenção de exercício aumentou a lipoperoxidação no tecido adiposo epididimal em animais magros comparativamente às demais intervenções (M+E vs M+HS e M+E+HS) (Figura 3B). Não foi constatado modificação na lipoperoxidação plasmática, indicada pela concentração de malondialdeído (MDA) em animais magros e obesos, em razão das intervenções de exercício, choque térmico ou da associação de ambos (Figura 3D).

Quanto ao índice H (razão eHSP70/iHSP70), apresentado na tabela 3, a resposta de animais magros e obesos diante das intervenções indica efeitos distintos no *status* inflamatório, em animais obesos e magros, e mostra-se tecido-dependente.

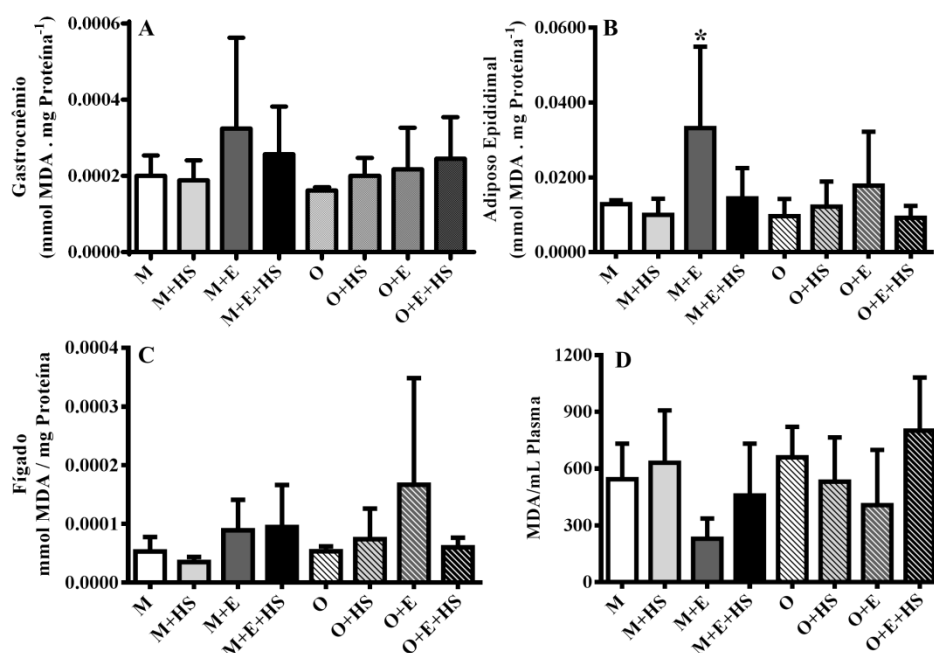


Figura 3. Concentração de MDA (malondialdeído) no músculo gastrocnêmio (A), no tecido adiposo epididimal (B), no fígado (C) e no plasma (D). Os dados estão expressos como média \pm DP. Análise estatística por ANOVA de uma via seguida do pós teste de *Tukey*. **A)** $P=0,4145$, $N=4-6$ por grupo. **B)** $*P=0,0070$ vs M+HS e M+E+HS, $N=4-7$ por grupo. **C)** $P=0,1985$ $N=4-6$ por grupo. **D)** $P=0,0883$, $N=3-6$ por grupo.

O choque térmico, em animais magros (M+HS), produz um índice H indicativo de condição pró-inflamatória intensa (índice $H > 5$) no tecido muscular (gastrocnêmio), que difere de todos os demais grupos de animais magros (M+HS vs M, M+E, M+E+HS), dos animais obesos submetidos à mesma intervenção (M+HS vs O+HS). No tecido hepático, na condição de choque térmico, também é observada uma condição imunoinflamatória, porém moderada (índice $H > 1 - 5$), e que se diferencia de todos os demais grupos de animais magros (M+HS vs M, M+E, M+E+HS), dos animais obesos submetidos a mesma intervenção (M+HS vs O+HS). Em animais obesos, o choque térmico produz uma condição imunoinflamatória moderada (índice $H > 1 - 5$) no tecido adiposo epididimal, e que se diferencia de todos os demais grupos de animais obesos (O+HS vs O, O+E, O+E+HS).

A condição de exercício físico não altera o valor do índice H em nenhum tecido, em animais magros e obesos.

Quando o exercício físico é associado ao choque térmico, nos animais magros, o índice H relativo aos tecidos muscular e hepático indica uma condição imunoinflamatória moderada (índice $H > 1 - 5$), que é distinta em relação aos animais obesos (M+E+HS vs O+E+HS).

Tabela 3. Índice H (eHSP70 / iHSP70).

eHSP70 / iHSP70	M	M+HS	M+E	M+E+HS	O	O+HS	O+E	O+E+HS
Plasma / Gastrocnêmio	1,00 \pm 0,37	10,00 \pm 3,28*	3,73 \pm 2,22	2,64 \pm 0,97†	0,67 \pm 0,31	1,39 \pm 0,64	0,49 \pm 0,19	0,65 \pm 0,71
Plasma / Fígado	1,00 \pm 0,69	4,69 \pm 2,17*	1,92 \pm 0,76	2,32 \pm 0,73†	0,62 \pm 0,17	1,05 \pm 0,37	1,34 \pm 1,40	0,38 \pm 0,30
Plasma / Ad. Epididimal	1,00 \pm 0,78	2,48 \pm 1,64	0,71 \pm 0,22	0,96 \pm 0,26	0,37 \pm 0,21	1,91 \pm 0,75§	0,24 \pm 0,13	0,53 \pm 0,25

Os dados estão expressos como média \pm DP. Análise estatística por ANOVA de uma via seguida do pós- teste de *Tukey*. * $P<0,0001$ vs M, M+E, M+E+HS, O+HS. † $P<0,0001$ vs O+E+HS. § $P=0,0109$ vs O, O+E, O+E+HS. $N=4-6$.

Na tabela 4 observamos o efeito das intervenções sobre a concentração de lipídios circulantes, em animais magros e obesos. O choque térmico isoladamente não causou modificação na concentração de lipídios

circulantes, em animais magros e obesos. O exercício físico aumentou a concentração circulante de triglicerídeos em animais obesos, quando comparado ao grupo submetido a uma sessão de choque térmico (O+E vs O+HS). Além disso, o exercício causou aumento da concentração de colesterol total em animais obesos quando comparado ao grupo correspondente nos animais magros (O+E vs M+E). A combinação do exercício físico com choque térmico aumentou a concentração de colesterol total em animais obesos comparativamente aos animais magros (O+E+HS vs M+E+HS).

Tabela 4. Perfil lipídico.

Variáveis/Intervenções	M	M+HS	M+E	M+E+HS	O	O+HS	O+E	O+E+HS
Triglicerídeo (mg/dL)	194,6±65,1	142,2±21,6	195,0±22,8	140,7±39,0	177,3±54,9	129,8±26,9	254,2±73,0*	180,5±49,3
CT (mg/dL)	68,0±9,7	72,3±8,4	78,0±15,1	77,7±7,4	88,7±10,3	84,4±14,2	98,3±14,7†	97,5±8,0§
HDL (mg/dL)	17,4±2,7	15,17±2,9	15,17±1,5	19,0±4,7	21,0±2,19	20,8±2,8	23,8±1,7	22,8±3,3
LDL (mg/dL)	11,7±11,8	25,7±9,6	28,8±13,4	29,9±8,2	32,2±10,5	37,6±12,8	27,8±15,5	38,7±13,5

CT (Colesterol Total), HDL (Lipoproteína de Alta Densidade), LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade). Os dados estão expressos como média ± DP. Análise por ANOVA de uma via, seguido do pós- teste de Tukey. * P<0,005 vs O+HS; † P<0,0001 vs M+E; § P<0,0001 vs M+E+HS; N= 4-8 por grupo.

Não foram constatadas alterações nos parâmetros hematológicos em qualquer condição experimental (Tabela S3, ver material suplementar).

Discussão

Neste estudo observamos questões importantes quanto ao uso e efeitos da terapia térmica, analisada em condição aguda: a) os efeitos de uma sessão de choque térmico são similares aos de uma sessão de exercício e b) os efeitos de ambas intervenções, isoladas ou em combinação, são diferentes em animais magros e obesos. De modo geral, os dados obtidos em nosso estudo revelam que tanto uma sessão de exercício como uma sessão de choque térmico, induzem a expressão de iHSP70. Contudo, o exercício foi capaz de induzir essa expressão em animais magros e obesos, e o choque térmico apenas em animais obesos. O uso das duas intervenções de modo associado potencializou a expressão de HSP70 em animais magros. O aumento nos níveis de iHSP70 muscular em resposta ao exercício foi de cerca de 30% em animais magros, o que foi potencializado pela combinação com o choque térmico, com o aumento de 54%. Já nos animais obesos observamos um aumento de 51% na concentração de iHSP70 muscular em resposta ao choque térmico, similar ao efeito do exercício, cujo aumento foi de 59%. Entretanto, a associação entre exercício e choque térmico, não teve efeito potencializador sobre a expressão de iHSP70 muscular, como o apresentado pelos animais magros.

A expressão intracelular de HSP70 (iHSP70) está associada a mecanismos antiapoptóticos e ações anti-inflamatórias. A ação anti-inflamatória da HSP70 reside especialmente no seu efeito inibitório sobre a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear NF-κB, que produz profundas implicações no sistema imunológico, em processos inflamatórios e em fatores reguladores da sobrevivência celular e da apoptose (Ran et al. 2004). Deste modo, pode-se dizer que ambas intervenções se revelam como estratégias terapêuticas de grande relevância para a proteção de tecidos insulino-dependentes contra processos inflamatórios crônicos de baixo grau e no combate à resistência à insulina.

Em indivíduos saudáveis, em resposta a desafios como o exercício, ocorre a indução de expressão gênica de HSP70 no músculo esquelético, principalmente pela transcrição do gene HSPA1A, responsável pela síntese da

isoforma induzível de 72 kDa, da família das HSP70. Por exemplo, em resposta a uma sessão de exercício a 70% do VO₂ máximo, ocorre um aumento de 6,5 vezes na quantidade de mRNA-HSP72 até 2 horas após o exercício, mantendo a quantidade de proteína elevada por até 8 horas após o esforço (Walsh et al. 2001). Já em indivíduos obesos com DM2, esta resposta encontra-se prejudicada, pois a expressão da HSP70 encontra-se diminuída em fibras musculares esqueléticas (Gupte et al. 2009; Rodrigues-Krause et al. 2012). Neste sentido, nossos dados são de extrema relevância, pois observamos que o exercício, mesmo de baixa intensidade, assim como o choque térmico, foram capazes de induzir aumento nos níveis de iHSP70 muscular. Nossos dados corroboram com dados anteriores obtidos em outros modelos animais (camundongos), nos quais o choque térmico também aumentou a expressão de HSP72 nos tecidos muscular esquelético, hepático e adiposo por até 24 horas (Chung et al. 2008) contribuindo para a homeostase glicêmica. A expressão de iHSP70 é fundamental na manutenção da sinalização insulínica para a captação de glicose muscular. A maior expressão de HSP70 inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias por meio da inativação NFκB (Asea, De Maio 2007) e por efeitos anti-inflamatórios diretos (Knowlton 2006) que repercutem numa melhor sinalização intracelular para a captação de glicose.

Observamos que o tecido muscular em animais obesos e intolerantes à glicose, responde a ambas intervenções quando aplicadas isoladamente, porém não é responsivo quando as intervenções são aplicadas de modo combinado, o que sugere uma menor tolerância à desafios sucessivos aplicados em um período de tempo de até 36 horas. Além disso, no tecido adiposo observa-se que a combinação de exercício com o choque térmico parece ter “suprimido” o efeito benéfico do exercício (aplicado isoladamente) sobre a expressão de iHSP70. A combinação entre choque térmico e exercício pode ter gerado nesses animais uma condição conhecida como “termotolerância”, na qual, após um estímulo que induz a síntese de iHSP70, um novo estímulo não gera uma nova síntese destas proteínas (Satyal et al. 1998). Além disso, sabe-se que indivíduos obesos apresentam um quadro de inflamação crônica de baixo grau (Krause et al. 2015b), baixos níveis de iHSP70, principalmente em tecidos sensíveis a insulina, além de um aumento da fosforilação de JNK no músculo esquelético (Chung et al. 2008). O aumento da fosforilação da JNK está associado com o declínio progressivo na capacidade celular de resposta ao estresse, marcado pela redução na expressão de HSP70, o que pode resultar da inibição do fator primário de transcrição de proteína de choque térmico 1 (HSF-1) (Kavanagh et al. 2009).

Nosso estudo demonstrou ainda que o tecido adiposo em animais magros responde diferentemente às condições de estresse comparado aos obesos, corroborando com achados anteriores do nosso grupo (Goettems-Fiorin et al. 2016). Os dados do presente estudo mostram que, nos animais magros, o tecido adiposo apresenta grau elevado de lipoperoxidação quando submetido a condição de exercício, diferentemente do que não foi observado nos demais tecidos e em animais obesos. A resposta distinta do tecido adiposo em relação a lipoperoxidação sugere que o uso de dieta hiperlipídica (dieta dos animais obesos) possa promover o desenvolvimento precoce de mecanismos de defesa nesse tecido, contra o estresse oxidativo e inflamação (DeFronzo 2009; Goettems-Fiorin et al. 2016), via expressão de HSP70. Níveis aumentados de iHSP70 proporcionam proteção contra o dano oxidativo tecidual (Newsholme et al. 2016).

Quanto à concentração de HSP70 extracelular plasmática (eHSP70), constata-se que os animais magros, mas não os obesos, responderam aos desafios de exercício e de choque térmico aumentando a eHSP70. A capacidade de exportação de eHSP70 pode configurar a manutenção de respostas rápidas diante desafios, mediados pelo sistema adrenérgico, como na situação de exercício (Heck et al. 2011, 2017; Schöler et al. 2016), o que parece

estar prejudicado nos animais obesos. Em outros trabalhos, com características metodológicas diferentes, já estão descritos níveis elevados de eHSP70 em indivíduos obesos (Rodrigues-Krause et al. 2012) diabéticos e não diabéticos (Krause et al. 2015c) e sua relação com a deterioração da sinalização insulínica (Cangeri Di Naso et al. 2015). A elevação dos níveis de eHSP70 pode fazer parte dos mecanismos de defesa do organismo, agindo como sinal de alerta entre células, papel conhecido como “chaperocina”, e a ausência de resposta observada, caracterizada pela baixa responsividade no aumento de eHSP70 em animais obesos, tanto pelo exercício como pelo choque térmico, pode indicar um organismo em estresse imunoinflamatório crônico.

Estudos sugerem que a razão entre eHSP70 plasmática e intracelular em linfócitos (iHSP70) mensura a habilidade do sistema imunológico na manutenção do equilíbrio pró-inflamatório (células Th1) e anti-inflamatório (células Th2), sobretudo em resposta ao exercício físico (Heck et al. 2017). Em nosso estudo, observamos que o *status* inflamatório estabelecido a partir do conteúdo da eHSP70 plasmática em relação a cada tecido (razão eHSP70 / iHSP70, Índice H) difere em relação ao desafio imposto e a condição de obesidade. A resposta imunoinflamatória observada, marcada pelo índice H, indica efeitos distintos das intervenções no *status* inflamatório em animais obesos e magros, e mostra-se tecido-dependente. Animais obesos apresentam uma condição imunoinflamatória moderada (índice H >1 – 5) apenas no tecido adiposo epididimal e somente quando expostos ao choque térmico, não sendo observadas alterações no *status* imunoinflamatório nos demais tecidos desses animais e em sob as demais intervenções. Em relação aos animais magros, observa-se maior resposta imunoinflamatória nos tecidos muscular e hepático e, por outro lado, não se observa resposta do tecido adiposo. Os animais magros respondem ao choque térmico com uma resposta muscular pró-inflamatória intensa (índice H > 5) e hepática moderada (índice H >1 – 5), porém não respondem ao exercício, somente quando este é associado ao choque térmico, quando os tecidos muscular e hepático apresentam uma resposta imunoinflamatória moderada.

O índice H tem sido utilizado na classificação do perfil imunoinflamatório de animais em diferentes estudos com distintos protocolos experimentais (Goettems-Fiorin et al. 2016; Schöler et al. 2016; Heck et al. 2017). Esse conjunto de trabalhos indica que o índice H possa servir de balizador para a classificação de níveis de estímulos, podendo assim caracterizá-los de forma individual como terapêutico ou prejudicial para a manutenção ou melhora da saúde. Este é o primeiro estudo que investiga o comportamento do índice H sob condições de exercício agudo, do choque térmico e da combinação de ambos, em condição de obesidade e intolerância à glicose (ver perfil glicêmico e biométrico na figura S2 e na Tabela S1, respectivamente, no material suplementar). Estudos com humanos evidenciam que a associação de estímulos musculares (por eletrodos) associados ao choque térmico potencializam a melhora em parâmetros como a inflamação, glicemia, dislipidemia, obesidade central e sinalização insulínica (Kondo et al. 2014), diminuindo o processo inflamatório crônico de baixo grau.

Com sua capacidade imunoinflamatória prejudicada, os animais obesos demonstraram ainda instabilidade metabólica frente ao exercício aeróbio leve. A análise do perfil lipídico em nosso estudo corrobora com outros achados indicativos de que os animais obesos e insulinoresistentes respondem distintamente aos desafios/estresse. Observamos que os animais obesos, diferentemente dos magros, apresentam elevação persistente da concentração de triglicerídeos e de colesterol, quando submetidos a sessão de exercício aeróbio leve, porém, não quando submetidos ao choque térmico. Esses dados sugerem que a condição de obesidade

diminui a tolerância a condições de exercício, mesmo de baixa intensidade, causando elevação de lipídios circulantes por várias horas após o desafio. O músculo esquelético durante o exercício aeróbio de intensidade leve a moderada utiliza a oxidação de ácidos graxos de forma predominante para a produção de energia, sendo necessária a captação de ácidos graxos circulantes e sua liberação pelo tecido adiposo durante a sessão de exercício (Belmonte et al. 2005). Estudos mostram que indivíduos saudáveis, após a realização de exercício aeróbio, apresentam um aumento nos triglicerídeos circulantes, o qual perdura por até 4 horas após o final da sessão de exercício (de Lima et al. 2015). Em seguida, ainda em resposta a sessão de exercício, os níveis de triglicerídeos circulantes começam a diminuir, não sendo mais observada nenhuma alteração nesta fração lipídica após 24h (Maraki, Maria I. and Sidossis 2008).

Uma concentração elevada de triglicerídeos 48 horas após a sessão de exercício, observada no presente estudo, pode indicar um desequilíbrio metabólico entre a liberação e utilização de ácidos graxos frente ao desafio do exercício físico, estabelecido pela condição de obesidade, pois quando a capacidade de armazenamento dos adipócitos é excedida, o excesso de lipídeos circulantes deposita-se ectopicamente em tecidos como o fígado e o músculo esquelético, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento de danos e alterações em sua estrutura e funções (DeFronzo 2009). Os triglicerídeos circulantes, quando em excesso, podem ligar-se à receptores do tipo *toll like 4* (TLR4), na membrana do tecido adiposo, provocando a liberação celular de citocinas inflamatórias (Degens 2010; Newsholme et al. 2012). Estas citocinas exercem ações parácrinas que perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, induzem resistência insulínica e disfunção vascular e cardíaca. Desta forma, o tecido adiposo possui importante papel no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas associadas à obesidade (Lee 2013; Richardson et al. 2013; Shimizu et al. 2013; Bleau et al. 2015).

Por outro lado, o aumento persistente na concentração de triglicerídeos circulantes não foi observada no grupo de animais obesos submetidos a uma sessão de choque térmico pós-exercício e, tampouco, naqueles submetidos somente ao choque térmico. Isso sugere que o choque térmico esteja favorecendo uma resposta metabólica mais eficiente após o exercício, apesar da obesidade. Nesse contexto, o choque térmico parece exercer um efeito protetor e benéfico sobre a homeostase lipídica evitando a aumento persistente da trigliceridemia pós-exercício.

Conclusão

O exercício e o choque térmico, agudamente, promovem resposta de citoproteção por meio do aumento da expressão de HSP70, sendo ela tecido-dependente e influenciada pela condição de obesidade. A intervenção de choque térmico produz em animais obesos, efeito análogo ao causado pelo exercício em animais magros. A associação do exercício com choque térmico potencializa a resposta imunoinflamatória em animais magros e favorece um melhor controle sobre o perfil lipídico, especialmente no que se refere aos triglicerídeos circulantes, em organismos em processo obesogênico.

Referências

Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v.105, p.121.

Asea AAA, De Maio A (2007). A história por dentro: funções anti-inflamatória do HSF1 e das proteínas de choque térmico. In: Alexander A. A. Asea and Antonio De Maio, *Protein Reviews, Volume 1: Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity* - Edited, v.1, cap.7, Ed. Springer.

- Bathaie SZ, Jafarnejad A, Hosseinkhani S, Nakhjavani M (2010) The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: A preliminary report. *Int J Hyperth* 26:577–585. doi: 10.3109/02656736.2010.485594
- Belmonte A, Aoki MS, Ap G (2005) Triacilglicerol intramuscular : um importante substrato energético para o exercício de endurance. 11:135–140.
- Bleau C, Karelis AD, St-Pierre DH, Lamontagne L (2015) Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 31:545–561. doi: 10.1002/dmrr.2617
- Bock PM, Krause M, Schroeder HT, et al (2016) Oral supplementations with l-glutamine or l-alanyl-l-glutamine do not change metabolic alterations induced by long-term high-fat diet in the B6.129F2/J mouse model of insulin resistance. *Mol Cell Biochem* 411:351–362. doi: 10.1007/s11010-015-2597-6
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brown ET, Umino Y, Loi T, et al (2005) Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. *Vis Neurosci* 22:615–8. doi: 10.1017/S0952523805225105
- BUEGE JA, AUST SD (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v.52, p.302-309.
- Cangeri Di Naso F, Rosa Porto R, Sarubbi Fillmann H, et al (2015) Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity* 23:120–129. doi: 10.1002/oby.20919
- Chang Y, Chen TL, Sheu JR, Chen RM (2005) Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:27–35. doi: 10.1016/j.taap.2004.08.011
- Chung J, Nguyen A-K, Henstridge DC, et al (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1739–44. doi: 10.1073/pnas.0705799105
- de Lima FD, Correia ALM, Teixeira D da S, et al (2015) Acute metabolic response to fasted and postprandial exercise. *Int J Gen Med* 8:255–260. doi: 10.2147/IJGM.S87429
- DeFronzo RA (2009) From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes* 58:773–795. doi: 10.2337/db09-9028
- Degens H (2010) The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting: Review. *Scand J Med Sci Sport* 20:28–38. doi: 10.1111/j.1600-0838.2009.01018.x
- Gava NS, Veras-Silva AS, Negrao CE, Krieger EM (1995) Low-Intensity Exercise Training Attenuates Cardiac -Adrenergic Tone During Exercise in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 26:1129–1133. doi: 10.1161/01.HYP.26.6.1129
- Goettems-Fiorin PB, Grochanke BS, Baldissera FG, et al (2016) Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *J Physiol Biochem*. doi: 10.1007/s13105-016-0503-7
- Guisbert E, Morimoto RI (2013) The regulation and function of the heat shock response. In: Morimoto RI, Christen Y (eds) *Protein Quality Control in Neurodegenerative Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–18
- Gupte A a, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC (2009) Heat Treatment Improves Glucose Tolerance and a High-Fat Diet. *Diabetes* 58:567–578. doi: 10.2337/db08-1070.
- Heck TG, Schöler CM, de Bittencourt PIH (2011) HSP70 expression: Does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 29:215–226. doi: 10.1002/cbf.1739
- Heck TG, Scomazzon SP, Nunes PR, et al (2017) Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock

- response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. *Cell Stress Chaperones* 22:271–291. doi: 10.1007/s12192-017-0771-3
- Henstridge DC, Bruce CR, Drew BG, et al (2014) Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes* 63:1881–1894. doi: 10.2337/db13-0967
- Hoff C (1980). Sounding board. Immoral and moral uses of animals. *N Engl J Med*, v. 302, n. 2, p. 115-118.
- Hooper PL (1999) Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus [5]. *N Engl J Med* 341:924–925.
- Hooper PL, Balogh G, Rivas E, et al (2014) The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* VO - 19 447. doi: 10.1007/s12192-014-0493-8
- Hu B, Mayer MP, Tomita M (2006) Modeling Hsp70-Mediated Protein Folding. *Biophys J* 91:496–507. doi: 10.1529/biophysj.106.083394
- Kavanagh K, Zhang L, Wagner JD (2009) Tissue-specific regulation and expression of heat shock proteins in type 2 diabetic monkeys. *Cell Stress Chaperones* 14:291–9. doi: 10.1007/s12192-008-0084-7
- Knowlton a a (2006) NFkappaB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc Res* 69:7–8. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.10.009
- Kondo T, Ono K, Kitano S, et al (2014) Mild Electrical Stimulation with Heat Shock Reduces Visceral Adiposity and Improves Metabolic Abnormalities in Subjects with Metabolic Syndrome or Type 2 Diabetes: Randomized Crossover Trials. *EBioMedicine* 1:80–89. doi: 10.1016/j.ebiom.2014.11.001
- Krause M, Bock PM, Takahashi HK, et al (2015a) The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extracellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clin Sci* 128:789–803. doi: 10.1042/CS20140695
- Krause M, Heck TG, Bittencourt A, et al (2015b) The chaperone balance hypothesis: The importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediators Inflamm*. doi: 10.1155/2015/249205
- Krause M, Ludwig MS, Heck TG, Takahashi HK (2015c) Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18:374–80. doi: 10.1097/MCO.0000000000000183
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685.
- Lee J (2013) Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes. *Arch Pharm Res* 36:208–222. doi: 10.1007/s12272-013-0023-8
- Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, et al (2016) Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian J Med Biol Res* 49:1–9. doi: 10.1590/1414-431X20155028
- Maraki, Maria I. and Sidossis LS (2008) NIH Public Access. *Nano* 6:2166–2171. doi: 10.1021/nl061786n.Core-Shell
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670–684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6
- Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, et al (2016) Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J* 473:4527–4550. doi: 10.1042/BCJ20160503C
- Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, et al (2012) Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: A critical role for amino acids. *J Endocrinol* 214:11–20. doi: 10.1530/JOE-12-0072
- Nunes RB, Tonetto M, Machado N, et al (2008) Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. *J Appl*

Physiol 104:1641–7. doi: 10.1152/japplphysiol.00062.2008

- Ran R, Lu A, Zhang L, et al (2004) Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK{gamma} and impairing NF-{kappa}B survival signaling. *Genes Dev* 18:1466–1481. doi: 10.1101/gad.1188204
- Richardson VR, Smith KA, Carter AM (2013) Adipose tissue inflammation: Feeding the development of type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology* 218:1497–1504. doi: 10.1016/j.imbio.2013.05.002
- Richter-Landsberg C (2007). Heat shock proteins: Expression and functional roles in nerve cells and glia. In: *Heat shock proteins in neural cells*. Austin: Landes Bioscience, p. 1-12.
- Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, et al (2012) Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: Does fat matter? *Cell Stress Chaperones* 17:293–302. doi: 10.1007/s12192-011-0319-x
- Satyal SH, Chen D, Fox SG, et al (1998) Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev* 12:1962–1974. doi: 10.1101/gad.12.13.1962
- Schöler CM, Marques CV, da Silva GS, et al (2016) Modulation of rat monocyte/macrophage innate functions by increasing intensities of swimming exercise is associated with heat shock protein status. *Mol Cell Biochem* 421:111–125. doi: 10.1007/s11010-016-2791-1
- Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Minamino T (2013) Adipose tissue inflammation in diabetes and heart failure. *Microbes Infect* 15:11–17. doi: 10.1016/j.micinf.2012.10.012
- Taylor B a, Phillips SJ (1996) Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 34:389–98. doi: 10.1006/geno.1996.0302
- USA-FAO – Food and Agriculture Organization. *Carbohydrates in Human Nutrition* (1997). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w8079e/w8079e00.htm#Contents>
- Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, et al (2001) Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Am J Physiol* 281:R386–R393.
- White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, et al (2013) Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 57:339–345. doi: 10.1590/S0004-27302013000500002
- Xia J, Grondin JM, Jakubowski JA, Lilly E (2005) Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. *BioMed* 230:777–784.
- Zanchi AC, Hil P, Saldiva N, Rhoden CR (2008) Chronic Nasal Instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) Induces Brain Lipid Peroxidation and Behavioral Changes in Rats. 795–800. doi: 10.1080/08958370802009060

Material Suplementar

Tabela Suplementar S1. Perfil biométrico.

Variáveis / Grupos	Magro	Obeso	Valor P
Número de Animais	24	26	-
Consumo de Ração^a			
g/semana	132,5 ± 5,1	79,5 ± 5,9	<0,0001
Kcal/semana	516,5 ± 16,8	465,0 ± 31,3	<0,0001
Peso Corporal^a			
Inicial (g)	276,6 ± 22,4	275,9 ± 19,5	NS
Final (g)	371,9 ± 33,7	407,4 ± 36,8	<0,0001
IMC ((g/cm²).100)^{b, c}	69,5 ± 3,9	73,5 ± 4,2	0,0011
Gordura Visceral^c			
Total (g)	12,9 ± 3,6	23,1 ± 3,7	<0,0001
Epididimal (g)	6,6 ± 1,8	10,7 ± 2,5	<0,0001
Retroperitoneal (g)	6,7 ± 1,9	12,7 ± 1,9	<0,0001
Índice de Adiposidade (%)^d	3,5 ± 0,8	5,9 ± 0,8	<0,0001
Eficiência Energética ((g/Kcal).10³)^e	53,2 ± 15,9	75,5 ± 15,8	0,0173

IMC - índice de massa corporal; ASC - área sob a curva. a) Dados coletados na 12ª semana de consumo de dieta hiperlipídica. b) O IMC do grupo obeso é 5,71% maior em relação ao grupo magro. c) Dados coletados na 14ª semana de consumo de dieta hiperlipídica. d) (gordura visceral total / peso corporal final) x 100. e) (ganho de peso (g) / consumo calórico total (Kcal)) x 10³.

Tabela Suplementar S2. Glicemia de Jejum.

Grupo	Glicemia de Jejum (mg/dL)			Valor P
	Pré-Dieta*	Pós-Dieta**	%	
Magro	80,90 ± 8,97	83,00 ± 6,32	↑2,60	0,2766
Obeso	80,35 ± 7,10	93,77 ± 6,97	↑11,06	<0,0001

*Glicemia de jejum realizada anterior ao consumo das dietas experimentais. **Glicemia de jejum realizada após 12 semanas do consumo de dieta hiperlipídica (obesos, N=26), ou dieta padrão (magros, N=24). Os dados estão expressos como média ± DP, e foram analisados com Teste t pareado.

Tabela Suplementar S3. Perfil Hematológico.

Variáveis/Intervenções	M	M+HS	M+E	M+E+HS	O	O+HS	O+E	O+E+HS
Leucócitos (unidades)	86,2±6,9	88,2±2,2	83,8±12,7	79,5±18,2	89,7±1,3	89,0±2,9	74,2±18,7	76,2±20,8
WBC (10³/mm³)	8,6±0,2	6,7±1,5	7,5±1,8	8,1±1,9	6,5±1,9	7,2±1,8	9,1±1,9	7,9±1,2
RBC (10⁶/mm³)	8,0±0,8	7,2±1,0	7,3±1,1	7,2±0,8	7,5±1,1	7,5±1,0	8,3±1,0	7,8±0,7
HGB (g/dL)	15,3±0,9	13,9±1,6	12,9±3,2	13,6±2,4	14,4±0,9	13,9±1,7	14,9±1,6	14,5±1,9
HCT (%)	10,6±1,0	9,5±1,1	10,3±3,5	10,3±1,6	9,8±0,9	9,7±1,0	11,7±1,8	11,2±1,4
PLT (10³/mm³)	778,0±149,0	641,0±255,0	668,0±190,0	723,0±129,0	795,0±101,0	783,0±109,0	954,0±309,0	812,0±137,0

WBC (Leucócitos), RBC (Eritrócitos), HGB (Hemoglobina), HCT (Hematócrito), PLT (Plaquetas). Os dados estão expressos como média ± DP. Analisados por ANOVA de uma via seguido do pós- teste de Tukey. N=4-7 por grupo.

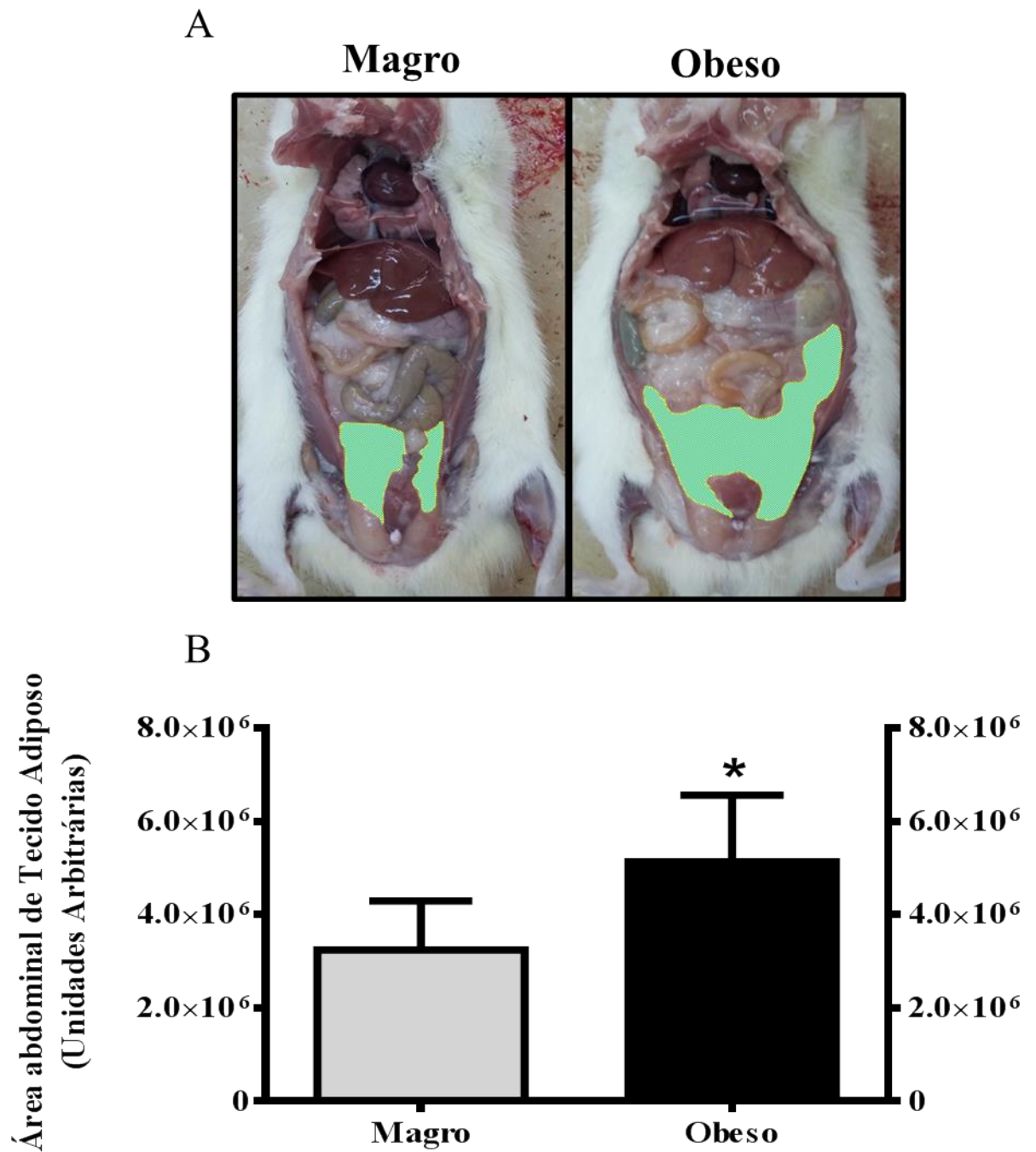


Figura Suplementar S1. Efeito da dieta hiperlipídica no tecido adiposo visceral. A) Imagens representativas da gordura abdominal visceral em ratos alimentados com dieta padrão (magro) e de ratos tratados com dieta hiperlipídica (obeso), demarcada pelo pontilhado amarelo/área central verde. B) Gráfico ilustrativo das proporções do tecido adiposo visceral em ratos magros e obesos (magro = $3,2 \pm 1,1 \times 10^6$; obeso = $5,1 \pm 1,4 \times 10^6$; UA. $P=0,0068$). Os dados estão expressos como média \pm DP e analisados por Teste t não pareado. N=17.

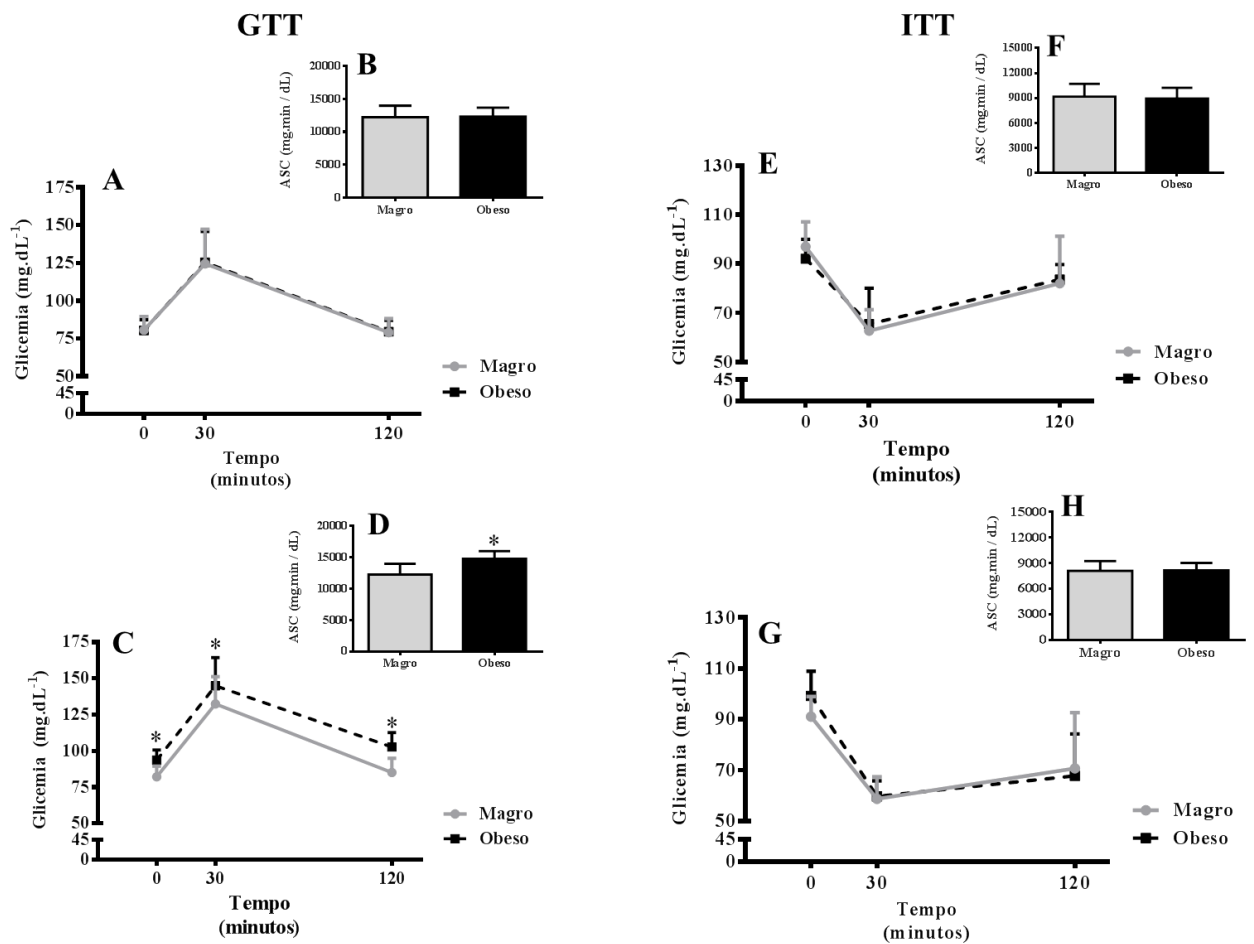


Figura Suplementar S2. Efeito da dieta hiperlipídica sobre o Teste de Tolerância a Glicose (GTT) e o Teste de Tolerância à Insulina (ITT). Curvas Glicêmicas referentes ao Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT): (A e E, GTT e ITT, respectivamente) Tempo zero e (C e G, GTT e ITT, respectivamente) Tempo 12 semanas. Área Sob a Curva (ASC) referente ao GTT (B) Tempo zero e (D) Tempo 12 semanas; e ao ITT (F) Tempo zero e (H) Tempo 12 semanas. Os dados estão expressos como média \pm DP. Analisados por ANOVA de 2 vias de medidas repetidas seguido do pós- teste de Sidak (A, C, E, G) e Teste t não pareado (B, D, F, H). * P < 0,0001 vs magro. N= 24-26.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo confirma e valida o modelo de indução de obesidade em ratos Wistar por meio do consumo de DHL. Nesse modelo pode-se observar o aumento do acúmulo de gordura visceral e o desenvolvimento de intolerância à glicose, sugerindo um quadro de resistência à insulina, após 12 semanas de consumo de DHL.

O estudo realizado permitiu avaliar os efeitos agudos das intervenções comumente estudadas e utilizadas de modo crônico, e previu efeitos benéficos e indica cuidados após cada sessão de exercício e choque térmico. Os dados do presente estudo indicam diferenças importantes na avaliação do efeito agudo (foco do presente trabalho) vs efeitos crônicos (apresentados em outros trabalhos mencionados no texto dessa dissertação), revelando, inclusive divergências quanto a resposta aguda e crônica diante dos desafios aplicados (exercício e choque térmico).

Além disso, esse trabalho apresentou resultados inéditos quanto ao efeito agudo da combinação de exercício e choque térmico em organismos magros e obesos, revelando respostas distintas relacionadas a condição de obesidade, nos diferentes tecidos investigados. Esses resultados trazem como perspectiva, a continuidade da investigação acerca do efeito da combinação de exercício e choque térmico aplicados de forma crônica, a longo prazo, o que já foi iniciado junto ao nosso grupo de pesquisa, tendo como perspectiva a elucidação das potencialidades terapêuticas da terapia térmica e da sua combinação com o exercício em organismos com disfunções metabólicas, como as observadas em indivíduos obesos.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ITEM 1

- ASEA, A. A. A., DE MAIO, A. A história por dentro: funções anti-inflamatória do HSF1 e das proteínas de choque térmico. In: Alexander A. A. Asea and Antonio De Maio, Protein Reviews, Volume 1: Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity - Edited, v.1, cap.7, Ed. Springer. 2007.
- BATHAIE, S. Z. et al. The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: a preliminary report. *Int J Hyperthermia*, v.26, n.6, p.577-585, 2010.
- BLEAU, C., et al. Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, v. 31, n. 6, p. 545-561, 2014.
- BRUCE, C. R. et al. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes. Evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defence mechanism. *Diabetes*, v. 52, p. 2338-2345, 2003.
- CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 105, n.5, p. 1739-1944, 2008.
- DEGENS, H. The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting. *Scand J Med Sci Sports*, v. 20, n. 1, p. 28-38, 2010.
- DE FRONZO, R.A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *DIABETES*, v. 58, 2009
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; GUOYAO, W. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, v. 18, p. 872-879, 2002.
- GOODYEAR, L. J., et al. Skeletal muscle plasma membrane glucose transport and glucose transporters after exercise. *J. Appl. Physiol.*, v. 68, p. 193– 198, 1990.
- GUPTE, A. A., et al. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*, v.58, n.3, p.567-578, 2008.
- HALLAL, P. C. et al. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet*, v. 380, n. 9838, p. 247-257, 2012
- HECK, T. G. Razão entre o conteúdo extracelular e intracelular de hsp70 como um sinal de alerta imunológico e marcador de intensidade de exercício. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 154, 2011.
- HECK, T. G., et al. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct*, v.29, n.3, p.215-226, 2011.
- HIRABARA S. M., et al. Role of fatty acids in the transition from anaerobic to aerobic metabolism in skeletal muscle during exercise. *Cell Biochem Funct.*, v. 24, p. 475-481, 2006.
- HOOPER, P. L. Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, v.341, n.12, p.924-925, 1999.

- HOOPER, P. L. e P. L. HOOPER. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones*, v.14, n.2, Mar, p.113-115. 2009.
- HOOPER, P. L. et al. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress and Chaperones*, v. 19, n. 4, p. 447-4664, 2014.
- HONG, E. G. et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*, v. 58, p. 2525-2535, 2009.
- HUNTER-LAVIN, C., et al. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.324, n.2, p.511-517, 2004.
- IRELAND, H. E., et al. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. *Methods*, v.43, n.3, p.176-183, 2007.
- KEANE, K.; NEWSHOLME, P. Metabolic Regulation of Insulin Secretion. In Gerald Litwack, editor: *Vitamins and Hormones*, v. 95, Burlington: Academic Press, 2014, pp. 1-33.
- KONDO, T. et al. Heat shock treatment with mild electrical stimulation safely reduced inflammatory markers in healthy male subjects. *Obes Res Clin Pract* , v. 4, p. e83-e162, 2010.
- KONDO, T. et al. Hyperthermia with mild electrical stimulation protects pancreatic beta-cells from cell stresses and apoptosis. *Diabetes*, v. 61, p. 838-847, 2012.
- KONDO, T. et al. The role of heat shock response in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab J*, v. 38, p. 100-106, 2014.
- KNOWLTON, A. A. NF-kB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation cardiovascular. *Cardiovascular Research*, v.69 , n.1 , p.7-8. 2006.
- KRAUSE, M. et al. The Chaperone Balance Hypothesis: The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes, the Effect of Exercise, and the Implications for Clinical Management. *Mediators of Inflammation*, p. 1-12, 2015a.
- KRAUSE, M. et al. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. *Current Opinion* , v. 18, n. 4, p. 374-380, 2015 b.
- LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. *Arch Pharm Res*, v.36, n.2, p. 208-222, 2013.
- LENZ, T.L.; SEYER, M.R. A pharmacological/physiological comparison of metformin and exercise. *American Journal of Lifestyle Medicine*, p. 118-120, 2013.
- MARCADENTI, A. et al. Diet and inflammation: Effects of macronutrients and dietary patterns. *International Journal of Cardiology and Lipidology Research*, v. 2, p. 7-13, 2015.
- MATSUYAMA, S. et al. Mild Electrical Stimulation Increases Stress Resistance and Suppresses Fat Accumulation via Activation of LKB1-AMPK Signaling Pathway in *C. elegans*. *PLoS One*, v.9, n.12, p.e114690, 2014.
- MORIMOTO, R. I. Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, v. 259, n. 5100, p. 1409-1410, 1993.

- MORINO, S. et al. Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. *PLoS One*, v. 3, p. e4068, 2008.
- NEWSHOLME, P. et al. Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide. *Clin Sci (Lond)*, v.118, n. 5, p. 341-349, 2009.
- NEWSHOLME, P.; KRAUSE, M. Nutricional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *Clin Biochem Rev*, v. 33, n. 2, p. 35-47, 2012.
- NEWSHOLME, P. et al. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses and beta-cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol*, v. 61, n. 11, p. 1528-1537, 2012.
- RETH, M. Antioxidant defences: endogenous and diet derived. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4ed, New York: Oxford University Press, p. 79-186, 2007.
- RICHARDSON, V. R. et al. Adipose tissue inflammation: feeding the development of type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*, v.218, n.12, p.1497-1504, 2013.
- RODRIGUES-KRAUSE, J. M. et al. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperones*, v.17, n.3, 2012.
- ROMIJN J. A. et al. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* , v. 265, p. E380-E391, 1993.
- RUSAI, K. et al. GSK-3 β inhibition protects mesothelial cells during experimental peritoneal dialysis through upregulation of the heat shock response. *Cell Stress and Chaperones*, v. 18, n. 5, p. 569-570, 2013.
- SANTOMAURO JR., A. C. et al. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinologia Metab*, vol. 52, n. 1, p. 120-125, 2008.
- SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, n. 1, p. 55-63, 2000.
- SHIMIZU, I., et al. Adipose tissue inflammation in diabetes and heart failure. *Microbes Infect*, v.15, n.1, p.11-17. 2013.
- SCHOLER, C. M. Efeito de diferentes intensidades de exercício físico agudo sobre as concentrações de HSP70 plasmática e expressão de HSP70 intracelular em monócitos circulantes de ratos: possível influência sobre a função imunoinflamatória de monócitos/macrófago. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. 120 p.
- SILVEIRA, L. R. et al. Regulação do Metabolismo de Glicose e Ácido Graxo no, músculo Esquelético Durante Exercício Físico. *Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. V. 55, n. 5, p. 303-013, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Aspectos clínicos e laboratoriais do diagnóstico de Diabetes e Pré-Diabetes, p. 5-8, 2015.

WALSH, R. C., et al. Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones*, v.6, n.4, p.386–393. 2001.

WILLIAMS, J. H. H.; et al. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. *Methods*, v. 43, n. 3, p. 176-183, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva, WHO, 2014. In:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA *CELL STRESS AND CHAPERONES*

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

MANUSCRIPT ORGANIZATION

Original Research Articles should follow the format and organization of most of the papers in the Journal, with Introduction, Methods, Results, Discussion, (Conclusions), References, Tables, Figure legends, and finally Figures.

Short Communications, and all other manuscripts (Perspective and Reflection Articles, Letters to Editor, Mini Reviews, and Meeting Reviews) should follow the format and organization of other similar manuscripts in the Journal.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.

- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article
 Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
 Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086
 - Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London
 - Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
 - Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
 - Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California
- Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

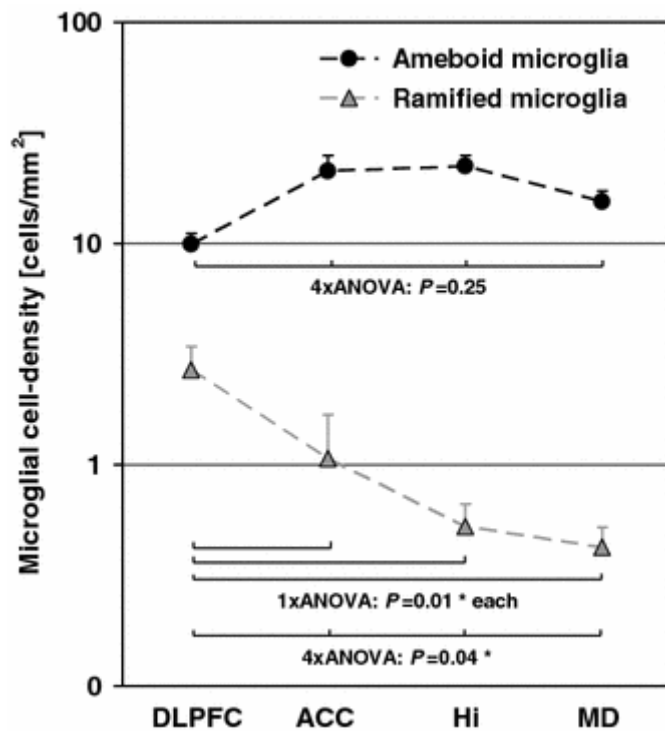
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

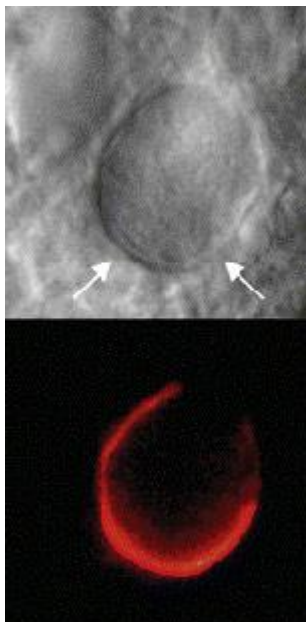
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



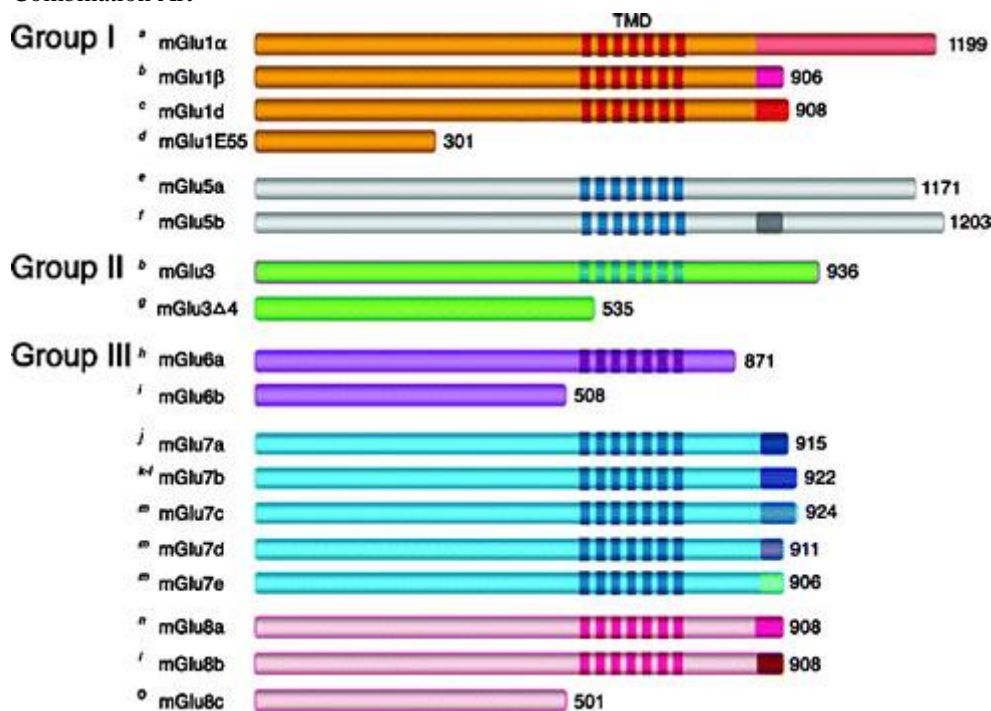
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

- [English language tutorial](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author’s institution may be informed.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

- [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#)

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Open Choice](#)

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- [Find more about the license agreement](#)

ANEXO 2 – PARECER CEUA – UNIJUÍ



Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUÍ

PARECER CONSUBSTANCIADO Nº. 001/2015

Protocolo de Pesquisa nº. 001/2015 de 23/12/2015.

Projeto: "TREINAMENTO FÍSICO ASSOCIADO À TERAPIA TÉRMICA NO COMBATE A RESISTÊNCIA A INSULINA: EQUILÍBRIO EXTRA E INTRACELULAR DE HSP70 COMO BIOMARCADOR DE INFLAMAÇÃO SUB-CLÍNICA NO DIABETES"

Finalidade: Pesquisa

Duração: Início: 01/10/2015 - Término: 01/11/2017

Pesquisador Responsável: Prof^o Thiago Gomes Heck

Colaboradores: Mirna Stela Ludwig; Claudia Ramos Rhoden; Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr; Matias Nunes Frizzo; Pauline Brendler Goettems; Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner;

Área do conhecimento: Ciências da Saúde

Cronograma de utilização de Animais:

Data: 01/10/2015 e 01/10/2016

Espécie: Camundongos B6

Sexo: Machos

Quantidade: 56

Período da Manutenção do(s) Animal(s): 6 meses

Avaliação do Protocolo de Pesquisa, segundo orientações da Lei Nº 11.794 de outubro de 2008.

PARECER DA COMISSÃO

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como APROVADO, conforme ata da reunião realizada em 27/02/2015. O mesmo atende aos Requisitos Fundamentais das Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIJUÍ,

assim como as responsabilidades do pessoal envolvido no uso de animais da Resolução Normativa Nº01 do CONCEA, de 09 de julho de 2010.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a esta CEUA, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final.

Ijuí, 27 de Fevereiro de 2015.



Prof. Fernando Silvério Ferreira da Cruz
Coordenador da CEUA/UNIJUÍ

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIJUÍ
Telefone: (55) 3332-0301
E-mail: ceua@unijui.edu.br
Rua do Comércio, 3000, Bairro Universitário, Ijuí/RS - Brasil CEP 98700-000.

REFERENCIAS QUE FALTAM NA DISSERTAÇÃO

USA-FAO – Food and Agriculture Organization. *Carbohydrates is Human Nutrition*. 1997.
Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w8079e/w8079e00.htm#Contents>.

Heat shock proteins and exercise adaptations. Our knowledge thus far and the road still ahead

Darren C. Henstridge, Mark A. Febbraio, Mark Hargreaves

Journal of Applied Physiology Mar 2016, 120 (6) 683-

691; **DOI:**10.1152/jappphysiol.00811.2015